

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**SZENZOROS NEUROPEPTIDEK SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA LÉGÚTI ÉS ÍZÜLETI GYULLADÁS,
VALAMINT FÁJDALOM ÁLLATKÍSÉRLETES
MODELLJEIBEN**



Helyes Zsuzsanna

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET**

2009.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI.....	6
I. TÉMAKÖR: A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY ÉRZŐIDEG-VÉGGZŐDÉSEK, A TRPV1 ÉS A SZOMATOSZTATIN SST₄ RECEPTOROK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA LÉGÚTI GYULLADÁS MODELLJEIBEN	21
I. 1. ELŐZMÉNYEK	21
I. 2. CÉLKITŰZÉSEK	24
I. 3. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	25
I. 4. EREDMÉNYEK	32
I. 4. 1. Fejezet: A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidek szerepe akut légúti gyulladásban.....	32
I. 4. 2. Fejezet: A TRPV1 receptor szerepe akut légúti gyulladásban.....	38
I. 4. 3. Fejezet: Az sst ₄ receptor lokalizációja, expressziójának változása és szerepe légúti gyulladásban.....	43
I. 4. 4. Fejezet: Sst ₄ receptor agonista vegyületek hatása akut és krónikus légúti gyulladás modelljeiben.....	51
I. 5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK.....	55
I. 6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	61
II. TÉMAKÖR: A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY IDEGVÉGGZŐDÉSEK, A TRPV1 ÉS SST₄ RECEPTOROK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA KRÓNIKUS ÍZÜLETI GYULLADÁS MODELLJÉBEN	63
II. 1. BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK.....	63
II. 2. CÉLKITŰZÉSEK.....	66
II. 3. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	67
II. 4. EREDMÉNYEK	72
II. 4. 1. Fejezet: A kapszaicin-érzékeny rostok és a belőlük felszabaduló szomatosztatin szerepe krónikus ízületi gyulladás patkánymodelljében.....	72
II. 4. 2. Fejezet: Az sst ₄ receptor szerepe krónikus artritisz egérmódeljében.....	76
II. 4. 3. Fejezet: Szintetikus sst ₄ receptor agonisták hatása krónikus ízületi gyulladásmodellekben.....	79
II. 4. 4. Fejezet: A TRPV1 receptor szerepe krónikus artritisz egérmódeljében.....	82
II. 5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK.....	85
II. 6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	89
III. TÉMAKÖR: A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY IDEGVÉGGZŐDÉSEK, A TRPV1 ÉS SST₄ RECEPTOROK, VALAMINT A PACAP-38 SZEREPE A NOCICEPCIÓBAN ÉS ANTI-NOCICEPCIÓBAN	90
III. 1. ELŐZMÉNYEK.....	90
III. 2. CÉLKITŰZÉSEK.....	95
III. 3. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	96
III. 4. EREDMÉNYEK.....	101
III. 4. 1. Fejezet: A TRPV1 receptor szerepe akut és krónikus nocicepció modellekben..	101
III. 4. 2. Fejezet: Sst ₄ agonisták hatása akut és krónikus nociceptív folyamatokra.....	104

III. 4. 3. Fejezet: A PACAP-38 eltérő perifériás hatásai nocicepció modellekben.....	108
III. 4. 4. Fejezet: A sztatikus mágneses tér antinociceptív hatása és a háttérben álló mechanizmusok.....	111
III. 5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK	114
III. 6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	122
IV. TÉMAKÖR: A SZELEKTÍV SST₄ RECEPTOR AGONISTA J-2156, A PACAP-38 ÉS AZ ENDOMORFIN-1 HATÁSAINAK HÁTTÉRÉBEN ÁLLÓ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA AKUT GYULLADÁSMODELLEKBEN ..	124
IV. 1. BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK	124
IV. 2. CÉLKITŰZÉSEK	127
IV. 3. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	128
IV. 4. EREDMÉNYEK	132
IV. 4. 1. Fejezet: A szelektív sst ₄ receptor agonista j-2156 hatásai különböző mechanizmusú <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> akut gyulladásmodellekben.....	132
IV. 4. 2. Fejezet: A PACAP-38 felszabadulása a kapszaicin-érzékeny afferensekből és hatása akut gyulladásos folyamatokra.....	136
IV. 4. 3. Fejezet: Az endomorfín-1 hatása szenzoros neuropeptidek felszabadulására <i>in vitro</i> és akut gyulladásos folyamatokra <i>in vivo</i>	141
IV. 5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK	144
IV. 6. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	149
AZ ÉRTEKEZÉSBEN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK, JÖVŐBELI KUTATÁSI IRÁNYOK	150
IRODALOMJEGYZÉK.....	154
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK, SZABADALMI BEADVÁNYOK	168
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	173

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

12-HPETE: 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav
ACE: angiotenzin konvertáló enzim
AEA: N-arachidonoil-etanolamin (anandamid)
ANOVA: variancia analízis (analysis of variance)
ATP: adenzin-trifoszfát
AUC: görbe alatti terület (area under the curve)
BSA: borjú szérum albumin (bovine serum albumin)
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát
cDNS: dezoxiribonukleinsav másolat
CFA: komplett Freund-adjuváns (complete Freund's adjuvant)
CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid (calcitonin gene-related peptide)
CRLR: kalcitonin receptor-szerű receptor (calcitonin receptor-like receptor)
C-SOM: ciklo-szomatosztatin, szomatosztatin receptor antagonist
DAB: diamino-benzidin
desArgHOE-140: dezargininHOE-140, bradikinin B₁ receptor antagonist
DNS: dezoxiribonukleinsav
ECAC: epiteliális Ca²⁺-csatorna (epithelial Ca²⁺ channel)
EC₅₀: effektív koncentráció 50 (maximális hatás feléhez tartozó koncentráció)
ED₅₀: effektív dózis 50 (maximális hatás feléhez tartozó dózis)
EDTA: etilén-diamin-tetraacetát
ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens eljárás (enzyme-linked immunosorbent assay)
EM: endomorfín
GH: növekedési hormon (growth hormone)
GHRH: növekedési hormon elválasztását serkentő hormon (growth hormone releasing hormone)
HE: hematoxin-eozin
HOE-140: bradikinin B₂ receptor antagonist
HRP: torma peroxidáz (horseradish peroxidase)
IFN-γ: interferon-γ
Ig: immunglobulin
IL: interleukin
i.m.: intramuszkuláris
i.p.: intraperitoneális
i.pl.: intraplantáris
IP₃: inozitol-triszfoszfát
KO: génhányos, géntörött (knockout)
LPS: lipopoliszacharid
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
MPO: mieloperoxidáz
mRNS: hírvivő ribonukleinsav (messenger RNS)
NADA: N-arachidonoil-dopamin
NAL: naloxon
NANC: non-adrenerg, non-kolinerg
NEP: neutrális endopeptidáz
NdFeB: neodímium-vas-bór ötvözet
NDGA: nordihidroguarénsav (nordihydroguarenic acid), lipoxigenáz-gátló
NGF: idegnövekedési faktor (nerve growth factor)

NK: neurokinin
NMDA: N-metil-D-aszpartát
NO: nitrogén-monoxid
oSMF: optimalizált sztatikus mágneses mező (optimized static magnetic field)
OVA: ovalbumin
PAC₁: PACAP receptora
PACAP: hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)
PAS: perjódsav-Schiff reagens
PBS: foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
Penh: enhanced pause, légúti ellenállással egyenesen arányos számított paraméter
PK: protein kináz
PMA: forbol-12-mirisztát-13-acetát
PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid
qRT-PCR: reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció
RAMP: receptor aktivitást módosító fehérje (receptor activity modifying protein)
RIA: radioimmunoassay
RI: légúti ellenállás
RNS: ribonukleinsav
RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute-ban kifejlesztett tápoldat
RTX: reziniferatoxin
s.c.: szubkután alkalmazás
SDS-PAGE: natrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis
SEM: átlag standard hibája (standard error of mean)
SOM: szomatosztatin
SP: P-anyag (substance P)
SRIF: szomatotropin felszabadulást gátló hormon (somatotropine release inhibiting factor)
sst: szomatosztatin receptor
Th₂: T helper 2 sejt
TMB: tetrametil-benzidin
TNF- α : tumor nekrosis faktor- α
trkA: tirozin-kináz A
TRPV1: tranziens receptor potenciál vanilloid 1
TRPA1: tranziens receptor potenciál ankirin 1
TSH: pajzsmirigy stimuláló hormon (thyreoid stimulating hormone)
VIP: vazoaktív intesztinális peptid
VPAC: VIP és PACAP közös receptora
VR1: vanilloid receptor 1
VRL: vanilloid-szerű receptor (vanilloid-like receptor)
WB: western blot
WT: vad típusú (wildtype)

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS, A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

Értekezésemben a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződés és a belőlük felszabaduló neuropeptidok patofiziológiai folyamatokban betöltött komplex szabályozó szerepét szeretném bemutatni. Ezek az eredmények 2003 és 2009 között teljes egészében hazai kutatásból születtek, de nemzetközi szinten az alapkutatás és a gyógyszerfejlesztés szempontjából is meghatározóvá váltak.

A klasszikus idegszabályozási elmélet szerint az érzőidegek a szenzoros stimulusokat és a fájdalmat közvetítik a test különféle részeiről (bőr, ízületek, belső szervek) a központi idegrendszer felé. A perifériás idegrendszer másik csoportja a befutó ingerekkel kiváltott reflexek útján efferens, azaz mozgató vagy vegetatív működéseket lát el. A kapszaicin-érzékeny érzőidegek az idegszabályozás elvi szempontjából különleges és érdekes harmadik csoportot képviselnek, ezek perifériás végződése nemcsak a klasszikus afferens működéssel rendelkeznek, hanem egyben efferens funkciót is ellátnak. Közvetlenül, reflex nélkül, olyan neuropeptidok szabadulnak fel belőlük, amelyek a beidegzési területen *neurogén gyulladásos* folyamatokat indítanak el. A neurogén gyulladást és az ezt közvetítő gyulladáskeltő neuropeptideket a 70-es évek végén fedezték fel, és ezzel új korszak kezdődött a kapszaicin-kutatások történetében, a „kapszaicin” kulcsszóval szereplő közlemények száma robbanásszerű emelkedésnek indult. A 80-as évek végén Pintér Erika és Szolcsányi professzor egy véletlennek köszönhetően megfigyelték, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőidegekből a gyulladáskeltő neuropeptidokon kívül –amelyeket addigra már viszonylag részletesen feltérképeztek- gátló hatású anyag(ok) is felszabadul(nak), a keringésbe kerül(nek) és a test távolabbi pontjain jelentősen csökkenti(k) a neurogén gyulladást. Ezzel a felfedezéssel a kapszaicin-érzékeny idegek működése, gyulladásban, fájdalomban betöltött szerepe kissé bonyolultabbá, de egyben még érdekesebbé vált. 1995-ben, közvetlenül általános orvosi diplomám megszerzése után, ebben a stádiumban kapcsolódtam be a csoport munkájába. Doktorandusz hallgatóként első feladatom a gátló hatásért felelős mediátor(ok) azonosítása volt. Sorra vettük azokat a molekulákat, amelyek jelenlétét korábban már kimutatták ezekben az idegrostokban, és amelyek gyulladásgátló/fájdalomcsillapító hatására utaló adatok rendelkezésre álltak. Számos szisztematikus kísérleti elrendezésben sikerült egyértelműen igazolnunk, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló és a vérkeringésbe jutó szomatosztatin közvetíti a megfigyelt szisztémás gyulladásgátló/fájdalomcsillapító hatást. Ezek a korábbi eredmények az 1999-ben megvédett

PhD dolgozatomban szerepeltek és közvetlen munkatársam, Pintér Erika MTA doktori értekezésének tárgyát képezték. Mivel az elmúlt 10 évben érdeklődésem elsősorban légúti és ízületi gyulladás, neuropátiás és gyulladásos fájdalomállapotok állatkísérletes modelljeire és a kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló neuropeptidek e folyamatokban betöltött szerepére irányult, jelen disszertáció lényegében ezekre a témakörökre koncentrálok.

A kapszaicin rövid farmakológiai története

A kapszaicin, a paprika (*Capsicum annuum* és *Capsicum frutescens*) csípős anyaga, kémiai szerkezetét tekintve alkaloid, 8-metil-N-vanillil-transz-6-nonénamid. A gyógyszer-tudományának korai időszakában, az 1870-es években Hőgyes Endre volt az első, aki kísérletesen vizsgálta a kapszaicin hatásait és arra következtetett, hogy az elsősorban az érzőidegekre hat (Hőgyes 1878). A népi gyógyászatban tapasztalati alapon már régóta használták ízületi gyulladások fájdalmas tüneteinek kezelésére az erős paprikás bedörzsölést, azonban a farmakológiai kutatásokban e témát több mint 7 évtizedig elhanyagolták.

A II. világháború után Jancsó Miklós szegedi farmakológus professzor gyulladásos folyamatok vizsgálatával foglalkozott és ezzel kapcsolatban kezdte el használni a kapszaicint. Az ő véletlen megfigyelése volt, hogy ez a fájdalmat okozó csípős irritáns anyag egy teljesen új típusú fájdalomcsillapító hatással rendelkezik. Munkája alapján bizonyítást nyert, hogy a kapszaicin nagy dózisainak ismételt adása kísérleti állatokban (egér, patkány, tengerimalac) az analgészia egy speciális formáját váltja ki. Az érzőideg-végződések érzéketlenekké váltak a legerősebb fájdalomkeltő kémiai ingerekkel szemben anélkül, hogy fizikai (mechanikai vagy elektromos) ingerekkel szembeni válaszkészségük változott volna. Ez az ún. *kapszaicin-deszenzibilizáció* jelensége, amelynek hátterében álló folyamatok akkoriban tisztázatlanok maradtak. Ezekből az adatokból kiindulva a későbbiekben elektrofiziológiai vizsgálatokkal világossá vált, hogy a fájdalomérző idegvégződések forró ingerekkel izgatható csoportja az, amely a kapszaicinnal szelektíven aktiválható, illetve nagy dózisok ismételt adása után ezek működése szelektíven károsítható (Jancsó 1960).

Jancsó professzor 1966-ban bekövetkezett korai halála után tanítványa, Szolcsányi János, aki később Pécsre került és jelenleg munkacsoportunk vezetője, folytatta a kapszaicinnal kapcsolatos kutatásokat a professzor feleségével, Jancsó-Gábor Arankával együttműködve. Első, az egyik legszínvonalasabb nemzetközi szakmai folyóiratban megjelent és azóta mintegy ezerszer idézett úttörő munkájuk 1967-ben jelent meg. Ebben leírták, hogy patkány n. saphenus-ának és n. trigeminus-ának izgatása arteriolás vazodilatációt, vaszkuláris permeabilitás-növekedést és plazmaproteinek extravazációját eredményezi a bőrben a

megfelelő beidegzési területeken. Nagy dózisú kapszaicinnal történő előkezelést követően ezen idegek sem ortodrómos kémiai, sem antidrómos elektromos ingerlése után nem alakult ki gyulladásos reakció. E válaszok hiányának alapján feltételezték, hogy a gyulladáskeltő mediátorok a kapszaicin-érzékeny fájdalomérző idegvégződésekből, a nociceptorokból szabadulnak fel (Jancsó et al. 1967). Ez a közlemény és számos későbbi kapszaicinnal foglalkozó munka is azonban több mint 10 évig visszhang nélkül maradt a szakirodalomban. A kapszaicin, mint potenciális farmakológiai eszköz a perifériás idegrendszer kutatásában, elsősorban akkor került az érdeklődés középpontjába, amikor Jessell és munkatársai 1978-ban közölték, hogy a kapszaicin P-anyag (substance P: SP) kiáramlását okozza a primér szenzoros idegvégződésekből anélkül, hogy befolyásolná a peptid felszabadulását az enterális és központi idegrendszeri neuronokból (Jessell et al. 1978). Egy évvel később Lembeck és Holzer kimutatták, hogy a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből felszabaduló SP közvetíti a neurogén plazmaprotein-extravazációt (Lembeck és Holzer 1979). E közlemények megjelenése után felélénkült az érdeklődés a kapszaicin, a kapszaicin-érzékeny érző idegrendszer és a szenzoros neuropeptidek iránt. Napjainkban világszerte számos kutatócsoport és gyógyszergyár foglalkozik ezzel a témával (Szolcsányi 2008; Gunthorpe és Chizh 2009). Jancsó Miklós fia, Jancsó Gábor, aki jelenleg Szegeden az Élettani Intézet professzora, ugyancsak bekapcsolódott a kapszaicin kutatásokba. Munkatársaival 1977-ben a *Nature*-ben közölte, hogy újszülöttkori kapszaicin-előkezelés patkányban a kapszaicin-érzékeny idegsejtek teljes pusztulását eredményezi (Jancsó et al. 1977).

Szolcsányi akadémikus saját, egyre bővülő munkacsoportjával mindvégig a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok kutatásánál maradt és az elmúlt több mint 40 évben számos nemzetközi szinten is rendkívül jelentős, áttörő tudományos eredményt mutatott fel. Nagy ajándéknak tartom, hogy én is az Ő tanítványa lehetek és 14 évvel ezelőtt megismerhettem ezt az érdekes, igazi magyar kutatási témát, ami a hatalmába kerített és tudományos érdeklődésemet végérvényesen meghatározta.

A kapszaicin receptora

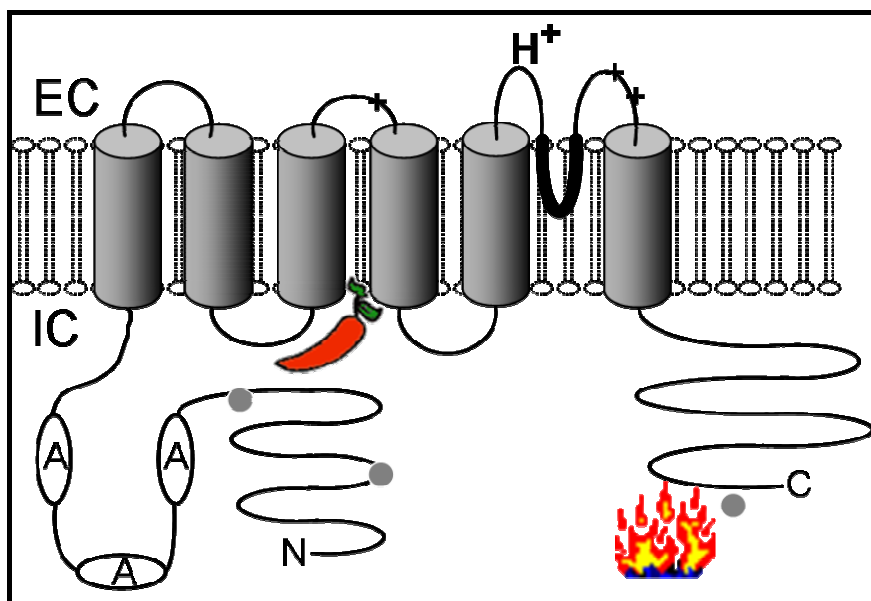
Azt az elméletet, hogy létezik „kapszaicin receptor”, azaz hogy ez a csípős anyag egy speciális molekulához kötötten fejt ki szelektív hatásait az szenzoros neuronokon, először Szolcsányi János és Jancsó-Gábor Aranka vetették fel egy 1975-ös közleményükben. Ebben a munkában a kapszaicin és más vanilloid struktúrájú vegyület nociceptív hatásait vizsgálták patkányban, és a szerkezet-hatás összefüggések alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a kapszaicin receptoriális úton hat. Már akkor megszerkesztették a receptor hipotetikus

modelljét is (Szolcsányi és Jancsó-Gábor 1975, 1976). Később patch clamp vizsgálatokkal sikerült bizonyítani, hogy a kapszaicin és egy másik vanilloid struktúrájú növényi eredetű vegyület, a reziniferatoxin (RTX), ugyanazt a kationcsatornát nyitja az érzőneuronok membránján (Bevan és Szolcsányi 1990). A kapszaicin receptort expresszáló gén azonosítása és a receptor szerkezetének megismerése azonban még évekig váratott magára. Ez az áttörést jelentő eredmény 1997-ben David Julius és munkacsoportja nevéhez fűződik, akik klónozták a patkány Vanilloid 1 Receptort (VR1). Ezt az első elnevezést az indokolta, hogy nemcsak a kapszaicinnal, hanem más vanilloidokkal is aktiválható volt (Caterina et al. 1997). Később a receptorok szerkezetén alapuló nemzetközi nomenklatura szerint ezt a nevet megváltoztatták, a ligand-függő kationcsatornát a Transiens Receptor Potenciál (TRP) nagycsaládba sorolták és a vanilloid család 1-es számú tagjaként Transiens Receptor Potenciál Vanilloid 1-nek (TRPV1) nevezték (Gunthorpe et al. 2002). Érdekes, hogy a TRPV család többi receptorára (TRPV2-6) nem hatnak olyan vanilloid struktúrájú vegyületek, mint a kapszaicin és az RTX. Ezek ugyanis valójában csak vanilloid receptorszerű struktúrák és epitheliális Ca^{2+} -csatornák, melyeket a régebbi nomenklatura vanilloid receptor-like (VRL), illetve epithelial Ca^{2+} channel (ECAC) névvel illetett (Gunthorpe et al. 2002).

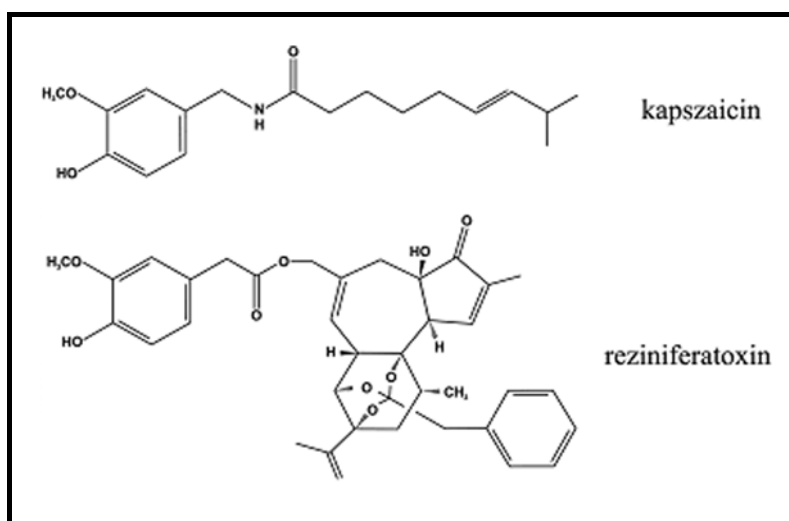
A később klónozott emberi TRPV1 receptor 92%-os hasonlóságot mutat a patkány receptor szerkezetével (Hayes et al. 2000; McIntyre et al. 2001). Ez a receptor 838 aminosavból álló fehérje, amit 6 β -redő szerkezetű transzmembrán domén épít fel. A csatornarégiót az 5. és 6. alegység közötti intracelluláris, hidrofób hurok alkotja. Ezek a struktúrák a membránban négy egységből álló tetramerré rendeződve nem-szelektív kationcsatornát alkotnak (**1. ábra**).

A TRPV1 polimodális szenzor funkciójú ioncsatorna, amely számos fizikai vagy kémiai ingerrel pl. fájdalmas, 43°C feletti hőmérséklettel (Tominaga et al. 1998) és pH 6 alatti proton-koncentrációval aktiválható az intra- és extracelluláris oldalról is. A kapszaicinen kívül többféle növényi eredetű vanilloid struktúrájú vegyület, mint a marokkói kutyatejfélében (*Euphorbia resinifera*) található reziniferatoxin (**2. ábra**), a feketeborsban (*Piper nigrum*) lévő piperin, a gyömbérből (*Zingiber officinale*) kivonható zingeron vagy a szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*) egyik anyaga, az eugenol, is képes receptorstimulációt okozni. Érdekes módon a kapszaicin lipofil jellegéből adódóan átjut a sejtmembránon, az intracelluláris régióban kötődik a receptorhoz és így nyitja meg a csatornát (Oh et al. 1996). Ezeken kívül léteznek endogén ligandok is, pl. az endokannabinoid N-arachidonoil-etanol-amin (AEA) vagy más néven anandamid (Caterina et al. 1997), a 12-hidroperoxi-eikozatetraénsav (12-HPETE), vagy az N-arachidonoil-dopamin (NADA). Az is ismert, hogy az egyik legerősebb fájdalomkeltő mediátor, a bradikinin, a B_2 receptorokon hatva szenzitizálja a TRPV1-et. Ebben az

intracelluláris másodlagos messenger mechanizmusok és a lipoxigenáz termékek szintézisének szabályozásán keresztül a foszfolipáz A₂ aktiválása játszanak szerepet (Piomelli et al. 2000; Shin et al. 2002). Emellett a csatorna működését jelentősen fokozzák a prosztaglandinok, pl. a gyulladásos folyamatokban kulcsfontosságú prosztaglandin E₂, vagy a prosztaciklin néven ismert prosztaglandin I₂ (Szállási és Blumberg 1999; Chuang et al. 2001). A receptor valódi endogén ligandja azonban egyelőre nem ismert. A TRPV1 –a többi TRP receptorhoz hasonlóan- nem sorolható be egyértelműen a ligandfüggő, de a feszültségfüggő ioncsatornák közé sem, hanem olyan termoszenzor, amely sokféle liganddal is aktiválható. Ennek alapján a TRP csatornák önálló receptortípust képviselnek (Szolcsányi 2008).



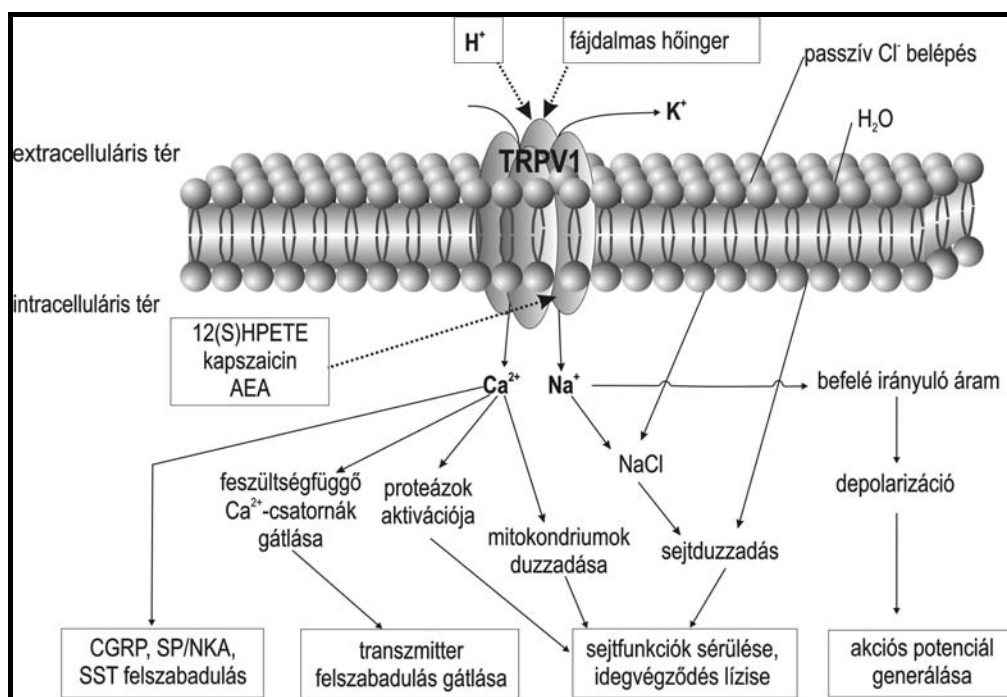
1. ábra. A TRPV1 receptor szerkezete. A receptor aktiválására képes ingerek a fehérje eltérő pontjain hoznak létre konformációváltozást, amely a kationcsatorna megnyílásához vezet. A szürke pontokkal jelölt helyek a protein kinázok támadáspontjai, amelyek foszforilációja a receptor érzékenységének fokozódásához vezet.



2. ábra. A kapszaicin és az RTX szerkezete

A TRPV1 receptor nagy mennyiségben megtalálható a hátsó gyöki és a trigeminus ganglionokban, specifikusan a kis és közepes átmérőjű szenzoros neuronokon (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998), vagyis a vékony mielinhüvelyes (A δ -) és a mielinhüvely nélküli (C-) rostokkal rendelkező neuronok sejttestjein és végződésein fordul elő (Holzer 1991).

A receptor aktiválódásakor a sejtbe Na⁺- és Ca²⁺-ionok áramlanak be, melyet K⁺-ion sejtől való kiáramlása követ. A Na⁺-ionok beáramlása elsősorban az akciós potenciál kialakulásáért felelős, melynek következményeképpen kialakul a nocicepció, fájdalomérzet. A Ca²⁺-influx a szenzoros neuropeptidek idegvégződésekből történő felszabadulásához vezet. Tartós vagy ismételt aktiváció hatására a sejtben felhalmozódó magas kationkoncentráció a citoplazma és a mitokondriumok duzzadását okozza, ennek hosszútávú következményeként a sejtek energiaforgalma csökken, az idegvégződés működésképtelenné válik. Ez a folyamat adja a molekuláris hátterét a nagy dózisú kapszaicinnal történő előkezelés hatására kialakuló deszenzibilizációnak (3. ábra).



3. ábra. A TRPV1 receptor aktivációjának és a csatornanyitás sejt szintű következményeinek vázlata

A TRPV1 receptort expresszáló polimodális nociceptorok funkcióinak vizsgálata a kapszaicin szelektív izgató és ezt követő blokkoló hatásának megfigyelésével kezdődött. A nagy dózisú kapszaicin- vagy RTX-előkezelés az egész végződés hosszantartó válaszképtelenségéhez vezet, a nociceptor semmilyen kémiai stimulusra nem reagál. Ezzel szemben a többi afferens rost működése nem változik és egyéb érzőfunkció, pl. mechanikai ingerek percepciója nem károsodik (Szolcsányi 1977). A kapszaicin-érzékeny afferensek fiziológiai/patofiziológiai

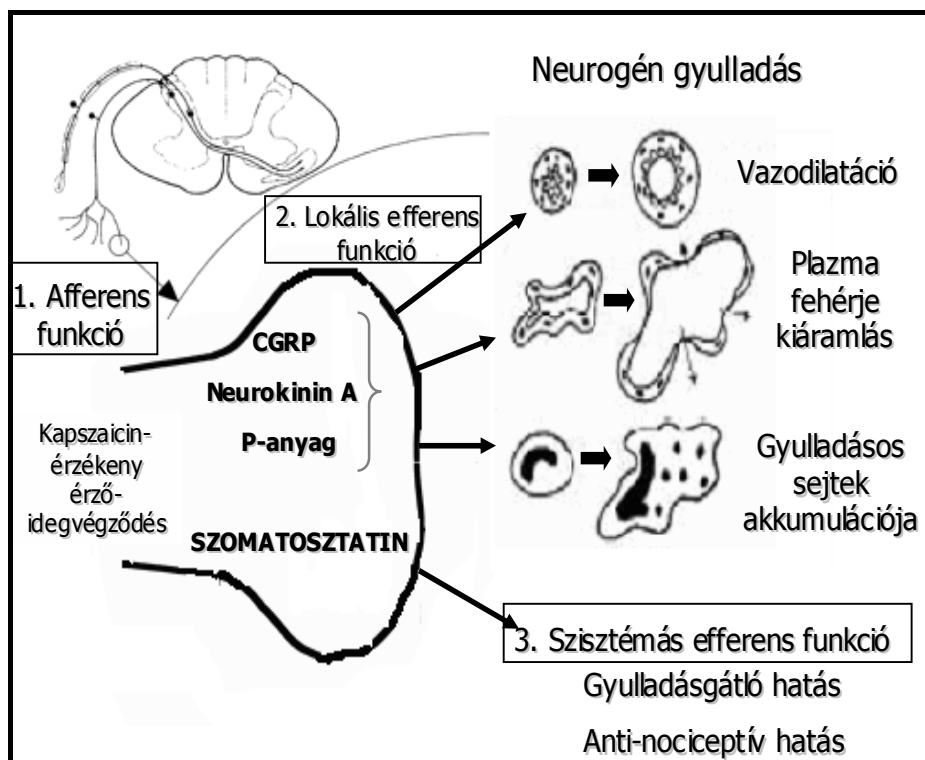
folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára tehát a TRPV1 agonistákkal történő deszenzibilizáció alkalmas, ezzel a módszerrel azonban a teljes idegvégződést inaktíváljuk (Bevan és Szolcsányi 1990; Szolcsányi 1993; Helyes et al. 2003), nemcsak izoláltan a TRPV1 csatorna funkcióját.

A receptor klónozása után a következő nagy előrelépés a kapszaicin-kutatások történetében akkor történt, amikor 2000-ben két kutatócsoport egymástól függetlenül TRPV1 receptor génhiányos egereket állított elő (Caterina et al. 2000; Davis et al. 2000). Ezek segítségével a TRPV1 ioncsatorna működése és jelentősége szelektíven vizsgálható *in vivo* modellekben.

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végzódések hármas funkciója

A TRPV1 receptort expresszáló érzőideg-végzódések különlegessége, hogy egyedülálló módon hármas funkcióval rendelkeznek: afferens, valamint lokális és szisztémás efferens funkciójuk is van. A **klasszikus afferens működés** során a kapszaicinnal vagy más stimulussal izgatott szenzoros idegvégzódések a központi idegrendszer felé közvetítenek idegaktivitást, ennek következtében alakul ki a fájdalomérzet, a nocicepció. Emellett az aktivált perifériás végzódésekből olyan neuropeptidok szabadulnak fel, amelyek erőteljes értágulatot, plazmafehérje-kiáramlást és gyulladásos sejtaktivációt okoznak a beidegzési területen, ezt a jelenséget összefoglalva *neurogén gyulladásnak* nevezzük (Szolcsányi 1988; Helyes et al. 2003). Ezek a gyulladáskeltő mediátorok a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), amely elsősorban vazodilatációt okoz, valamint a tachikininek, pl. a SP és a neurokinin A (NKA), melyek a plazmaprotein-extravazációért felelősek. Ezek a folyamatok közvetítik a kapszaicin-érzékeny afferensek **lokális efferens funkciót** (Szolcsányi 1984a,b; Maggi és Meli 1988). A neurogén gyulladásnak jelentős szerepet tulajdonítanak számos betegség, pl. a reumatoid arthritisz, az asztma, a pszoriázis, az ekcéma és a kontakt dermatitisz, valamint gyulladásos bél- és szembetegségek patomechanizmusában (Maggi 1995; Szolcsányi 1996a). Jelenleg egyetlen olyan gyógyszercsoport sem áll rendelkezésre, amely hatékonyan gátolná e betegségek neurogén gyulladásos komponensét (Helyes et al. 2003).

Munkacsoportunk kutatásai derítették fényt arra, hogy ugyanezen aktivált szenzoros idegvégzódésekből az előzőekben felsorolt gyulladáskeltő neuropeptideken kívül szomatosztatin is felszabadul, amely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásokkal rendelkezik. Ez az érzőideg-végzódések harmadik, **szisztémás efferens funkciója** (Szolcsányi et al. 1998a,b; Helyes et al. 2000, 2004), amelyet a szomatosztatin endokrin és parakrin hatásainak mintájára Szolcsányi professzor *szenzokrin hatásnak* nevezett el (Szolcsányi et al. 2004) **(4. ábra)**.



4. ábra. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések hármas funkciója

A kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló szenzoros neuropeptidek

1. Fájdalom- és gyulladásokeltő hatású neuropeptidek

a.) Az aktivált kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekben felszabaduló neuropeptidek egyik csoportját a **tachikininek** alkotják. Ide sorolható a SP, valamint a neurokinin A és B (NKA és NKB). Hatásaikat három G-proteinhez kapcsolt tachikinin receptoron keresztül fejtik ki, amelyeket NK_1 , NK_2 és NK_3 receptornak nevezzük. A SP legnagyobb affinitással az NK_1 receptorokhoz kötődik, amelyek a posztkapilláris venulák endothelsejtjein, a makrofágok és limfociták membránjában, a polimorfonukleáris sejteken és a hízósejteken találhatók (Regoli et al. 1994; Cao et al. 1999; Patacchini és Maggi 2001). Ezek aktivációjával érpermeabilitás-fokozódást és plazmaprotein-kiáramlást vált ki, stimulálja a limfociták proliferációját, citokinek termelését, a hízósejtek aktivációját, a T-sejtek kemotaxisát, valamint a neutrofil granulociták akkumulációját (Grant 2002). Az SP kationos peptid, így nem-receptor mediált interakcióba is lép a hízósejtek membránjával. A degranuláció következtében felszabaduló hisztamin a H_1 receptorokon, a szerotonin $5-HT_3$ receptorokon keresztül pozitív feedback útján fokozza a neuropeptidek felszabadulását a szenzoros

idegvégződésekből (Holzer 1988; Szállási és Blumberg 1999). A gyulladásos érválasz korai fázisáért a felszabaduló neuropeptidek, míg a későbbi fázisáért a hízósejtekből felszabaduló mediátorok (hisztamin, szerotonin, prosztaglandinok, leukotriének stb.) felelősek (Holzer 1988).

Az NKA az NK₂ receptorokhoz mutatja a legnagyobb affinitást, a SP-hez hasonlóan erőteljes plazmafehérje-kiáramlást idéz elő, továbbá simaizom-kontrakciót vált ki és stimulálja a gyulladásos sejteket (neutrofil granulocitákat, limfocitákat, makrofágokat) elsősorban a periférián, de a központi idegrendszerben is (de Swert és Joos 2006). Az NKB-t kötő NK₃ receptor főként a központi idegrendszerben található, de jelen van a perifériás idegvégződéseken is (Frossard és Advenier 1991; Massi et al. 2000), e mechanizmusoknak azonban kisebb jelentőséget tulajdonítanak a neurogén gyulladásos folyamatokban.

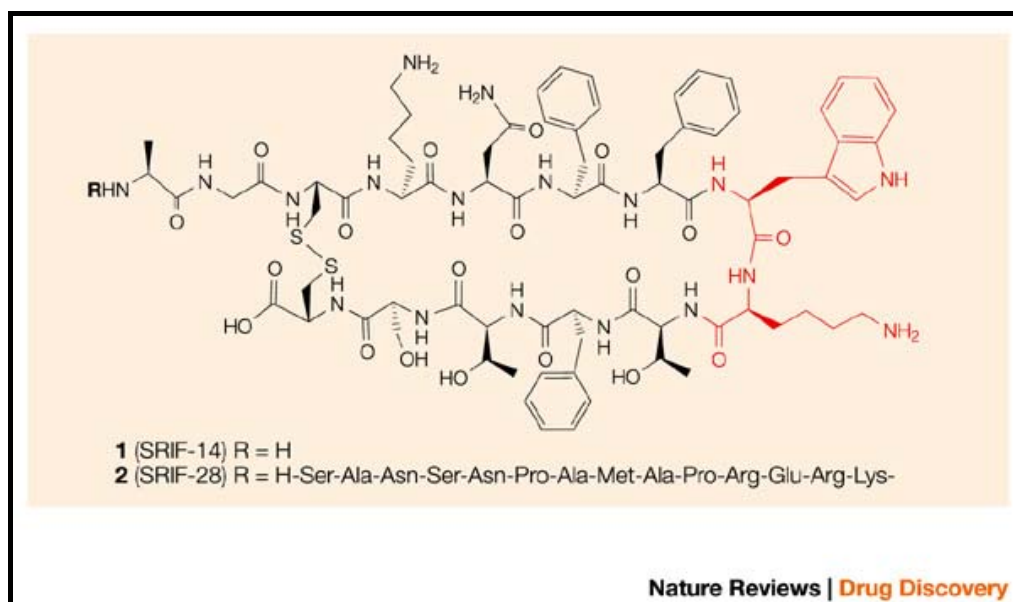
b.) A 37 aminosavból álló **CGRP** felfedezése Amara és munkatársai nevéhez fűződik (Amara et al. 1982). Egymástól kevéssé eltérő két formája az α CGRP és a β CGRP, melyek biológiai hatásaikat a CGRP1 és CGRP2 receptorokon fejtik ki (van Rossum et al. 1997). E receptorok szerkezetileg egy CRLR egységből (calcitonin receptor-szerű receptor) és egy RAMP-1 egységből (receptor-aktivitást módosító fehérje 1) épülnek fel (Njuki et al. 1993; McLatchie et al. 1998) és G_s-fehérjéhez kapcsolódnak. A CGRP –ahogy azt a neve is mutatja- egy családba sorolható a calcitoninnal, az amilinnal és az adrenomedullinnal (Poyner et al. 2002). Erős vazodilatátor hatással rendelkezik, amely főképp a CGRP1 receptoron keresztül valósul meg. A CGRP fokozza az adenilát-cikláz aktivitást, amelynek következtében intracellulárisan megnő a cAMP mennyisége. Ez aktiválja a protein kináz A-t, a foszforiláció hatására megnyílnak az ATP-függő K⁺-csatornák. A folyamat eredménye az érfali simaizom relaxációja és erőteljes értágulat (Edvinsson et al. 1985; Han et al. 1990; Hughes és Brain 1994). A CGRP érpermeabilitást fokozó hatását nem közvetlenül, hanem a SP hatásának potencírozásával fejt ki (Cao et al. 2000), amelyben az játszik elsődleges szerepet, hogy gátolja a SP degradációjáért felelős neutrális endopeptidáz enzimet (Holzer 1988). Mindemellett a CGRP komplex immunmodulátor funkciókkal is rendelkezik. Csökkenti a proinflammatorikus citokinek termelődését és fokozza az antinociceptív interleukin-10 (IL-10) felszabadulását a makrofágból. Ezzel szemben a granulocita-akkumulációt stimulálja (Barnes 2001).

2. Fájdalom- és gyulladásgátló hatású neuropeptidek

a.) A **szomatosztatin**, vagy más néven szomatotropin (growth hormone, GH) felszabadulását gátló faktor (somatotropine release inhibitory factor: SRIF; SOM), felfedezése Krulich és munkatársai nevéhez fűződik. 1968-ban bizonyították egy olyan „faktor” létezését a hipotalamusz extraktumban, amely gátolta a GH felszabadulását a hipofízis elülső lebenyéből (Krulich et al. 1968). A szomatosztatin 14, illetve 28 aminosavból álló ciklikus peptid **(5. ábra)** formában számos helyen előfordul a szervezetben (Brazeau 1986). Megtalálható a központi és a perifériás idegrendszerben (Parsons et al. 1976; Reichlin 1983), a gasztrointesztinális traktus neuroendokrin sejtjeiben, a hasnyálmirigyben, a vesében, a mellékvesében, a pajzsmirigyben, gyulladásos sejtekben, ivarszervekben (Hofland és Lamberts 1996; Reubi et al. 1999; ten Bokum et al. 2000). Az ízületekben az aktivált szinoviális sejtek és az immunsejtek is szekretálnak szomatosztatint, amely autokrin vagy parakrin módon fejti ki hatását (Pintér et al. 2006). A szomatosztatin gátló hatást gyakorol számos hormon (pl. GH, glukagon, inzulin, gasztrin, szekretin,olecisztokinin, motilin, pankreatikus polipeptid, prolaktin, pajzsmirigy stimuláló hormon: TSH) szekréciójára, a gasztrointesztinális motilitásra és az emésztőnedvek termelésére. Gátolja a tumorsejtek proliferációját, valamint erős immunmodulátor hatással rendelkezik. Csökkenti a B-limfociták IgA, IgM és IgE szekrécióját, gátolja a T-limfociták IL-2, IL-4, IL-10 és interferon- γ (IFN- γ) termelését, a neutrofil granulociták kemotaxisát, a makrofágok fagocitát, és a természetes ölősejtek (NK sejtek) killer aktivitását (ten Bokum et al. 2000; Krantic et al. 2004). A szomatosztatinnak a központi idegrendszerben neuromodulátor szerepe van, gátolja más neurotranszmitterek (glutamát, szerotonin, acetil-kolin) és neurohormonok (growth hormone releasing hormone, GHRH) felszabadulását. Befolyásolja a lokomotoros aktivitást és a kognitív funkciókat, jelentőségét számos pszichiátriai és neurológiai kórképben igazolták (Vécsei és Widerlöv 1988).

A szomatosztatin az idegelemek közül elsősorban a kapszaicin-érzékeny, TRPV1 receptort expresszáló szenzoros neuronokban szintetizálódik és tárolódik. Többféle állatkísérletes modellben és különböző fájdalomkórképekben kimutatták, hogy a kívülről beadott szomatosztatin csökkenti a fájdalmat (Lembeck et al. 1982; Chrubasik 1991; Karalis et al. 1994; Fioravanti et al. 1995). Munkacsoportunk akut kísérleti elrendezésekben számos bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok aktivált perifériás végződéseiből felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin szisztémás

gyulladáscsökkentő és antinociceptív hatásokat fejt ki (Szolcsányi et al. 1998a, b; Thán et al. 2000; Helyes et al. 2000, 2001, 2004).

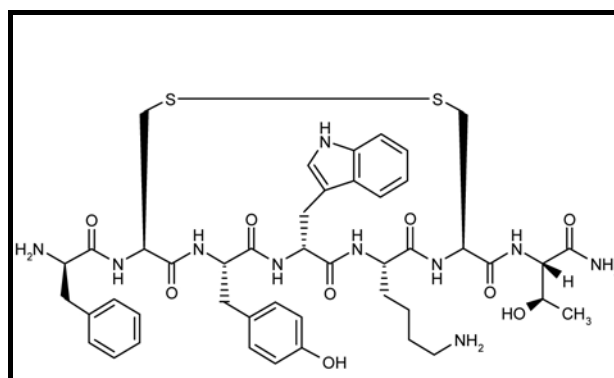


5. ábra. A szomatosztatin-14 és szomatosztatin-28 szerkezete
 (forrás: Weckbecker et al. 2003)

A SOM szerteágazó hatásait saját receptorai közvetítik. Eddig öt G_i -proteinhez kapcsolt szomatosztatin receptort klónoztak egérben, patkányban, illetve emberben, amelyeket sst_1 , sst_2 , sst_3 , sst_4 és sst_5 névvel illették (Hoyer et al. 1995; Patel 1999). Ez az öt sst receptor szintetikus szomatosztatin analóg-kötő képessége alapján két csoportra osztható. A SRIF1 csoporthoz tartoznak az sst_2 , sst_3 és sst_5 receptorok, amelyek nagy affinitással kötnek oktapeptid analógokat (pl. az oktreotidot), míg a SRIF2 csoportba sorolt sst_1 és sst_4 receptorok alacsony oktapeptid analóg-kötő képességgel rendelkeznek (Hoyer et al. 1995; Pintér et al. 2006). Számos irodalmi adat bizonyítja, hogy az endokrin hatást a SRIF1 csoportba tartozó receptorok közvetítik (Raynor és Reisine 1992). Elsősorban munkacsoportunk eredményei azt mutatják, hogy a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatás a másik csoporthoz, vagyis az sst_1 és sst_4 receptorokhoz köthető (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002; Solcsányi et al. 2004; Pintér et al. 2006). Bár e receptorok klónozása elősegítette a szomatosztatin fiziológiai/patofiziológiai szerepével kapcsolatos kutatásokat, különösen nagy előrelépést a receptor génhiányos egerek előállítása jelentett.

A natív szomatosztatin terápiás alkalmazását rendkívül széles hatásspektruma és nagyon rövid (3 percnél kevesebb) plazma eliminációs féleletideje akadályozza (ten Bokum et al. 2000). Stabil, szelektív sst_4/sst_1 agonisták azonban új terápiás lehetőséget nyújthatnak a

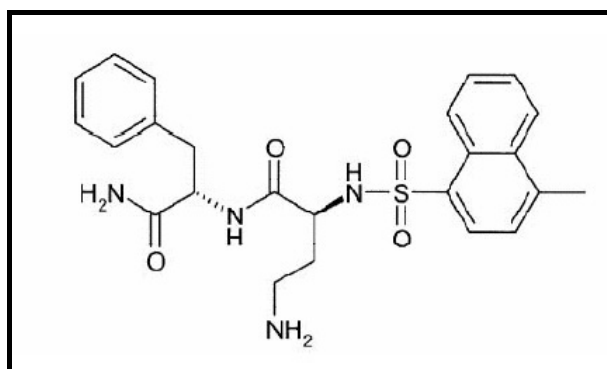
gyulladáscsökkentésben és a fájdalomcsillapításban. E vegyületek nagy előnye, hogy nem rendelkeznek a szomatosztatin sst₂, sst₃ és sst₅ receptorai által közvetített endokrin hatásokkal. Az MTA Peptidbiokémiai Kutatócsoportja által szintetizált stabil, ciklikus heptapeptid a TT-232 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂), amely legnagyobb affinitással az sst₄/sst₁ receptorokhoz kötődik (Helyes et al. 2005) **(6. ábra)**. Az N-terminális végen található D-fenilalanin aromás oldallánca olyan konformációt eredményez, amely megvédi a diszulfidhidat az enzimatisz degradációtól. A TT-232 nem befolyásolta a növekedési hormon és a gasztrin szekrécióját, azonban potens antiproliferatív hatással rendelkezett és akut nocicepció és gyulladásmodellekben jelentős gátló hatást fejtett ki (Kéri et al. 1996; Helyes et al. 2000, 2001). A TT-232 széles dózistartományban (5 mg/kg-ig) atoxikusnak bizonyult, LD₅₀ érték nem volt meghatározható. Egerekben a legmagasabb, 120 mg/kg dózis több héten keresztül történő ismételt adása sem okozott pusztulást, csupán 10%-ban tapasztaltak enyhe, átmeneti testsúlycsökkenést. A hematológiai paraméterek, a kvalitatív vérkép, különféle szervek szövettani képe és a gyomor-vékonybél nyálkahártya integritása nem változott a TT-232 e nagy dózisának tartós adagolását követően. Ez a dózis kb. 1000-szer magasabb, mint ami akut gyulladásmodellekben szignifikáns gátló hatást eredményezett (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002). Patkányban teljes test autoradiográfiás vizsgálatokkal nagyon alacsony, mindössze 0.1 µg/g TT-232 koncentrációt detektáltak az agyban 30 perccel 2 mg/kg i.v. ¹⁴C-TT-232 injekció után, ami a vér-agy gáton történő minimális penetrációs képességre utal. A legnagyobb, 5 mg/kg i.v. dózis beadását követően semmiféle központi idegrendszeri hatást nem tapasztaltak (nem közölt adatok, a vegyület preklinikai dokumentációjában megtalálhatók).



6. ábra. TT-232 szerkezete

A szelektív, nagy affinitású sst₄ receptor agonista J-2156 nem peptid szerkezetű, szulfonamido-peptidomimetikum, pontos kémiai szerkezete (1'S,2S)-4-amino-N-(1'-karbamoil-2'-feniletil)-2-(4''-metil-1''-naftalénszulfonamino)-butánamid. E vegyületet a Juvantia Pharma (Turku, Finnország) szintetizálta **(7. ábra)**. A J-2156 nanomolos affinitással

kötődik az emberi $ss4$ receptorhoz, ami a natív szomatosztatin kötődési affinitását is meghaladja, valamint közel 400-szoros szelektivitást mutat az $ss4$ -hez a másik négy szomatosztatin receptorhoz viszonyítva (Engström et al. 2005). A receptor-aktivációt jelző ciklikus AMP-tesztben a natív SOM-14-hez vagy SOM-28-hoz hasonlóan teljes agonistaként viselkedik. Egy másik G-protein-aktivációs funkcionális tesztben 2.5-szer erősebb válaszokat adott, mint a natív szomatosztatin. E tulajdonságai alapján e molekulát a „szuperagonista” jelzővel illették (Engström et al. 2005). További *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy a J-2156 ismételt alkalmazás után sem okoz deszenzibilizációt, ami fontos szempont e molekula esetleges terápiás alkalmazásának vonatkozásában (Engström et al. 2006).



7. ábra. A J-2156 molekula szerkezete

b.) A hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptidet, a **PACAP**-ot (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) eredetileg birka hipotalamuszból izolálták (Miyata et al. 1989). A szekretin-glukagon-vazoaktív intesztinális peptid (VIP) család tagja, ugyanis háromdimenziós vizsgálatok kimutatták, hogy alapvető szerkezeti rokonságot mutat a család többi tagjával (Segre és Goldring 1993; Wray et al. 1993). A legszorosabb, 68%-os egyezést a VIP szerkezetével mutat, adenilát cikláz-aktiváló hatása azonban legalább 1000-szer erősebb a VIP-énél (Gottschall et al. 1990; Sherwood et al. 2000). Két formája létezik: az emlős szervezetekben 90%-ban előforduló 38 aminosavból álló PACAP-38, és a 27 aminosavból álló PACAP-27. Patkányban a legnagyobb koncentrációban a hipotalamuszban és a herében fordul elő (Arimura et al. 1991), de az endokrin mirigyekben (Vigh et al. 1993; Mikkelsen et al. 1995), az ivarszervekben (Shioda et al. 1996), a gasztrointesztinális traktusban (Hannibal et al. 1998), a légzőrendszerben (Moller et al. 1993) és a bőrben (Odum et al. 1998) is expresszálódik. Szenzoros neuropeptidként tartják számon, mivel megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában (Dickinson és Fleetwood-Walker 1999; Dickinson et al. 1999), a hátsó gyöki ganglionokban (Moller et al. 1993; Dun et al. 1996; Parsons et al. 2000), a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben (Zhang et al. 1996; Fahrenkrug és

Hannibal 1998), pl. az ízületi tokot ellátó afferensekben (Uddmann et al. 1998), de a központi idegrendszer számos területén is (Mulder et al. 1994). A PACAP rendkívül sokféle hatást fejt ki, szabályozza a neurotranszmitterek felszabadulását (May et al. 2000), értágulatot, illetve bronchodilatációt okoz, fokozza a bélmotilitást, növeli egyes hormonok koncentrációját a vérben (Hamelink et al. 2002), szabályozza a sejtproliferációt és gátolja az apoptózist (Vaudry et al. 2002). Ezek a hatások speciális receptorokon keresztül valósulnak meg. Két kötőhely-típust mutattak ki PACAP- és VIP-kötő képességük alapján. Az I-es típusú kötőhelyhez a PACAP mindkét formája nagy affinitással kötődik, a VIP viszont csak alig (Gottschall et al. 1990; Lam et al. 1990; Suda et al. 1992). A II-es típusú kötőhelyhez a PACAP és a VIP is hasonló affinitással kötődik, ezen belül viszont két altípust is elkülönítenek a szekretinhez való affinitás alapján (Tatsuno et al. 1990; Vaudry et al. 2000). A receptorokat később a kötőhelyek szerkezete alapján klónozták, és PAC₁, valamint VPAC₁/VPAC₂ receptoroknak nevezték el (Harmar et al. 1998). Mindhárom receptor neuronokon, simaizom sejteken és számos gyulladásos sejten megtalálható, stimulációjuk G_{s/q}-proteinhez kapcsolt mechanizmusokat indít el, ezen keresztül aktiválódik az adenilát-cikláz, illetve foszfolipáz C rendszer (Dickinson és Fleetwood-Walker 1999; Vaudry et al. 2000; Zhou et al. 2002; Somogyvári-Vígh és Reglődi 2004).

c.) Régi megfigyelés, hogy a morfin és az enkefalinamid gátolja a neurogén gyulladást, azonban nem befolyásolja a nem-neurogén gyulladásos folyamatokat (Barthó és Szolcsányi 1981). Későbbi vizsgálatok igazolták, hogy az **opioid peptidek** megtalálhatók a kapszaicin-érzékeny érzőneuronokban, onnan stimuláció hatására felszabadulnak és a beidegzési területen fontos szabályozó szerepet játszanak különféle gyulladásos válaszokban (Holzer 1988). Az opioidok gátolják az immunsejtek proliferációját, a kemotaxist, a szuperoxid- és citokin-termelést, valamint a hízósejtek degranulációját (Bryant et al. 1990). Az opioid receptorok (μ , δ és κ) az sst receptorokhoz hasonlóan G_i-proteinhez kapcsolódnak, lokalizációjukat immunhisztokémiai, molekuláris biológiai és elektrofiziológiai adatok bizonyították a primér szenzoros neuronok sejttestjén és perifériás végződésein egyaránt. Valószínűleg a gyulladásos és immunsejtekből felszabaduló, de lehetséges, hogy magukból az idegvégződésekből származó opioid peptidek ezek endogén ligandjai (Schafer et al. 1996; Machelska et al. 2002). Az opioid peptidek a szenzoros idegvégződések ingerelhetőségének csökkentésével, valamint gyulladás- és fájdalomkeltő neuropeptidek felszabadulásának gátlásával antinociceptív hatást fejtenek ki (Stein et al. 1990, 2001). A bőrben található mielinizálatlan rostok kb. egyharmada

μ és δ receptorra immunpozitivitást mutat (Coggeshall et al. 1997). Gyulladásos körülmények között a μ opioid receptorok denzitása jelentősen fokozódik a szubkután területen lévő érzőideg-végződéseken, ami arra utal, hogy ezek a receptorok fontos szerepet játszanak a gyulladás és a nocicepció szabályozásában (Mousa et al. 2002). Stein és munkatársai csaknem 20 évvel ezelőtt közölték, hogy a patkánytalpban gyulladás során felszabaduló μ receptor agonista β -endorfin perifériás antinociceptív hatást fejt ki (Stein et al. 1990). Később több adat is alátámasztotta, hogy a gyulladásos fájdalom hatékony endogén szabályozói az immunsejtekből felszabaduló opioid peptidek, amelyek a szenzoros végződéseken található μ receptorokat aktiválják (Schafer et al. 1996; Machelska et al. 2002). Emellett κ receptor agonista endogén opioid peptidek, mint a dinorfin A és a hemorfin-7, perifériás gyulladásgátló hatásait is leírták (Sanderson et al. 1998). Az **endomorfínok** (endomorfín-1: EM-1 és endomorfín-2: EM-2) 12 évvel ezelőtt felfedezett 4 aminosavból álló endogén opioid peptidek. Különlegességük a többi opioid peptiddel összehasonlítva az eltérő kémiai szerkezetük és a μ receptorok iránti nagyfokú szelektivitásuk (Zadina et al. 1997; Prewloczki és Prewloczka 2001). Az endomorfínok megtalálhatók a perifériás és központi idegrendszerben, a kapszaicin-érzékeny afferensekben, valamint nem-neurális sejtekben is, pl. az immunsejtekből (Horváth 2000). Neuroanatómiai lokalizációjuk alapján szerepük számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban felmerült, mint pl. neuroendokrin funkciók és kognitív működések szabályozásában, fájdalom- és stresszválaszok befolyásolásában. Az irodalmi adatok többsége az EM-ok analgetikus, elsősorban a központi idegrendszeri hatásaira fókuszál, néhány adat azonban gyulladáscsökkentő (Jessop 2006) és vazodilatátor hatásokról is beszámol (Horváth 2000). Az EM-2 elsősorban a gerincvelőben és számos agyterületen található, a periférián a szenzoros rostokban és az immunsejtekből az EM-1 dominál (Jessop et al. 2002). A perifériás gyulladásos és nociceptív folyamatokban ezért elsősorban az EM-1 szerepe valószínűsíthető (Barin és McDougall 2003; Jessop 2006; Fichna et al. 2007).

I. TÉMAKÖR

A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY ÉRZŐIDEG-VÉGZŐDÉSEK, A TRPV1 ÉS A SZOMATOSZTATIN SST₄ RECEPTOROK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA LÉGÚTI GYULLADÁS MODELLJEIBEN

I. 1. ELŐZMÉNYEK

A közelmúltban pályázati támogatások segítségével kialakítottunk egy régiókban egyedülálló állatkísérletes légzésfunkciós laboratóriumot, amely lehetővé teszi különféle eredetű légúti gyulladásos folyamatok integratív vizsgálatát.

Akut tüdőgyulladásban a fehérvérsejtszám jelentős növekedése tapasztalható neutrofil granulociták és makrofágok infiltrációjával. Ezek a leukociták gyulladásos citokineket (TNF- α , IL-1 β) és egyéb gyulladásos mediátorokat (protonok, bradikinin, leukotriének, prosztaglandinok, stb.) termelnek, amelyek aktiválják, illetve szenzitizálják a szenzoros idegvégződéseket. Szövettanilag diffúz alveoláris károsodás látható, jelentős mértékű intersticiális fibrózissal, résznyire szűkült légterekkel, fokozott nyákszekrécióval. Az alveoláris szeptumok fala megvastagodik a gyulladásos sejtek beáramlásának hatására.

Az asztma a légutak krónikus gyulladása, amelyet hiperreaktivitás és rohamokban jelentkező reverzibilis bronchiális obstrukció jellemez. Eredet és patomechanizmus alapján allergiás (extrinsic) és nem-allergiás (intrinsic) asztmát különíthetünk el. Az allergiás asztma klasszikus I. típusú hiperszenzitív reakció, a hízósejtek felszínéhez allergénspecifikus IgE antitestek kötődnek, majd egy Th₂-limfociták által közvetített mechanizmust elindítva a szervezet túlérzékenyvé válik. Ismételt allergén bejutásakor aktiválódnak a már szenzibilizált hízósejtek, degranulációval felszabadulnak a bennük lévő mediátorok (pl. hisztamin), melyek elindítják a gyulladásos folyamatokat. A reakcióban eozinofil és neutrofil granulociták is részt vesznek, melyek oxidatív károsodást okoznak a bronchusok, bronchiolusok epithel rétegében. A leváló sejttörmelék a képződött váladékkal együtt elzárhatja a hörgők lumenét, amit súlyosbít a nyálkahártya-ödéma és a bronchusgörcs is. Nem allergiás (intrinsic) asztmában az epithelsejtek között és mögött található szenzoros irritáns receptorok (C-rostok) izgatása, illetve szenzitizációja történik nem specifikus ingerekkel, pl. irritánsokkal, protonokkal, lipoxigenáz termékekkel, hideggel, prosztaglandinokkal. Az ingerület a vagusközpontba jut,

ahol átkapcsolódik, majd a paraszimpatikus ganglionok közvetítésével a posztganglionális efferens végződésekből acetilkolin szabadul fel. Ez okozza a bronchokonstriktiót, a kapilláris-permeabilitás növekedését és a hízósejt-degranulációt. Közvetlenül az aktivált érőideg-végződésekből is felszabadulnak gyulladásokeltő szenzoros neuropeptidek, amelyek neurogén gyulladást okoznak és fokozzák a légúti válaszkésztséget (Nagy 2003).

A krónikus obstruktív légúti betegségben a bronchiális obstrukció szövetkárosító gázok és részecskék inhalációjának hatására kialakuló, kóros gyulladásos reakció következménye. Jellemző, hogy a bronchusok és bronchiolusok falában megsaporodnak a neutrofil granulociták, az aktivált makrofágok, valamint a limfociták, tipikus krónikus gyulladásra jellemző kép alakul ki. A csillósörők károsodnak, majd fokozatosan elpusztulnak. A kehelysejtek túltengése, a submucosában lévő nyákmirigyek hiperpláziája figyelhető meg. A légúti váladék megsaporodik és sűrűvé, tapadóssá válik. A kilégzési áramlás korlátozottságát a kislégutak gyulladásos szűkülete és a tüdőszövet destrukciója okozza. A széteső neutrofil granulocitákból és a makrofágokból szabad gyökök, proteolitikus enzimek szabadulnak föl. Ez az alveolusfal pusztulását, a légzőfelszín beszűkülését, a tüdőszövet rugalmasságának csökkenését okozza, amely emfizéma kialakulásához vezet.

Számos korábbi irodalmi adat igazolta, hogy a légutak kapszaicin-érzékeny peptiderg afferensekkel való rendkívül gazdag szenzoros innervációja (Barnes 1990; Lundberg 1995; Watanabe et al. 2005) nemcsak az érző/fájdalomérző működésekben játszik fontos szerepet, hanem a belőlük felszabaduló neuropeptideken keresztül bronchokonstriktiót (Szolcsányi és Barthó 1982) és gyulladást is kiváltanak (Lundberg 1995; Maggi 1995; Szolcsányi 1996 a,b). A vegetatív idegrendszer mellett tehát e non-adrenerg, non-kolinerg (NANC) rostok effektor működésének változásai is jelentős tényezők a gyulladásos légúti betegségek patomechanizmusában. A napjainkban népbetegségnek tekinthető asztma kialakulásában és a háttérben álló gyulladásos folyamatok fenntartásában fontos szerepet játszanak a hörgőket beidegző kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló gyulladásokeltő neuropeptidek. A SP, az NKA és a CGRP jelenlétét több fajban is kimutatták a tüdőben található kapszaicin-szenzitív mielinizálatlan C-típusú és vékonyan mielinizált A δ -rostokban (Kraneveld et al. 2000). Ezekből az idegvégződésekből a gyulladásokeltő neuropeptidek különféle stimulusok (gyulladásos mediátorok, protonok, neurotoxinok, cigarettafüst) hatására felszabadulnak a beidegzési területen és serkentik a gyulladásos reakciók vaszkuláris és sejtes fázisát egyaránt (Bloom és Polak 1985; Lundberg 1995; Uddman et al. 1997). Ma már az is bizonyított, hogy a tachikininek, elsősorban a SP és a néhány éve felfedezett hemokininek (Page 2004), az immunrendszer sejtjeiben is szintetizálódnak. A két fő metabolizáló enzim az angiotenzin

konvertáló enzim (ACE) és a neutrális endopeptidáz (NEP). Mivel az erek endothelsejtjeiben található ACE főként az intravaszkuláris tachikinineket képes bontani, elsősorban a NEP aktivitása határozza meg a légutak tachikinin-válaszkészségét.

A CGRP és a SP vazodilatációval és plazma-extravazációval járó neurogén gyulladást okoz a tüdőben. Az előzőekben vázolt szenzoros-effektor mechanizmus jelentős szerepet játszik a bronhokonstrikcióban és a nyálkahártya-ödémában, így a fokozott légúti ellenállás kialakulásában (Lundberg 1995). A SP serkenti továbbá az erek proliferációját, ez a hatás tehető felelőssé az asztmában szenvedők légutaiban tapasztalható megváltozott érstruktúráért. A SP és az NKA a tüdő fibroblasztjait is stimulálja, ezzel hozzájárul az asztmásokban tapasztalt fibrotikus elváltozásokhoz (Barnes 2001). A tachikininek az immun- és gyulladásosejtek működését is serkentik, a P-anyag nem-receptor mediálta hatással degranulálja a hízósejteket és az eozinofil granulocitákat, valamint serkenti a kemotaxist. A tachikininek fokozzák az alveoláris makrofágokban a gyulladásosejtek (pl. IL-6) termelését (Barnes 2001; Joos et al. 2001). Patkánykísérletekben nyert adatok alapján az NK₁ receptorok elsősorban a neurogén gyulladásosejtek reakcióiban és a nyákszekrécióban játszanak szerepet, az NK₂ receptorok inkább a bronhokonstrikcióban és a bronchiális hiperreaktivitásban fontosak (Advenier et al. 1997; Lagente és Advenier 1998; Joos et al. 2001).

A kapszaicin-érzékeny légúti afferensek szerepe a gyulladásban és következményes hiperreaktivitásban azonban korántsem ennyire egyértelmű. A fentiekben ismertetett, neurogén gyulladást közvetítő funkcióra vonatkozó eredményekkel ellentétben több korábbi irodalmi adat utal arra is, hogy patkányban a kapszaicin-szenzitív rostoknak védő szerepe van különböző légúti gyulladás-modellekben (Hashiba et al. 1989; Bowden et al. 1996; Long et al. 1996; Franco-Penteado et al. 2005). Újszülöttkori kapszaicin-kezelés után, amely az afferens C-rostok irreverzibilis károsodását eredményezte, szignifikánsan fokozódott intratracheális lipopoliszacharid-kezelés hatására a bronchoalveoláris mosófolyadékban a neutrofil granulociták száma, az összfehérje mennyisége és a TNF- α koncentrációja (Long et al. 1996). Újszülöttkori kapszaicin-előkezelést követően jelentősen súlyosabb volt továbbá az ovalbumin-indukálta allergiás légúti gyulladás (Franco-Penteado et al. 2005), illetve a *Mycoplasma pulmonis* okozta idült tüdőgyulladás (Bowden et al. 1996). A szenzoros idegvégződéseket által közvetített protektív mechanizmus hátterében álló mediátor(ok)ra vonatkozóan azonban e szerzők nem végeztek kísérleteket és nem vontak le következtetéseket.

I. 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Mivel a kapszaicin-érzékeny afferensek légúti gyulladásban betöltött szerepére vonatkozóan az irodalmi adatok ellentmondásosak, kísérletsorozatunk első célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk e rostok és a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidek jelentőségét endotoxinnal kiváltott szubakut légúti gyulladásban és következményes bronchiális hiperreaktivitásban egérben.

2. Célunk volt továbbá, hogy receptor génhiányos egerek segítségével e szenzoros rostokon lokalizálódó TRPV1 ioncsatorna szabályozó szerepét vizsgáljuk a gyulladásban és bronchiális válaszkészség fokozódásban az endotoxin-indukálta pneumonitisz modellben.

3. Bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a tüdő TRPV1 receptorainak aktivációjával szomatosztatin szabadul fel, amely gátolja a gyulladásos folyamatokat és a hiperreaktivitást. Feltételeztük, hogy e gátló hatásokat az sst₄ receptor közvetíti, de e receptor lokalizációjára és funkciójára vonatkozóan nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok. Ezért munkánk harmadik célja az volt, hogy megvizsgáljuk az sst₄ receptor expresszióját és gyulladás hatására történő változását egértüdőben. További kísérleteket végeztünk az sst₄ légúti gyulladásban betöltött szerepére vonatkozóan receptor génhiányos egerek segítségével. Annak eldöntésére, hogy az egérkísérletek eredményei extrapolálhatók-e emberi patofiziológiai folyamatokra, ép és gyulladt humán tüdőmintákon is megvizsgáltuk az sst₄ receptor expresszióját.

4. Miután az sst₄ receptor jelenlétét, gyulladás hatására történő expresszió-fokozódását és gátló szerepét bizonyítottuk a tüdőben, kísérletsorozatunk következő célja az volt, hogy megvizsgáljuk szintetikus sst₄ agonisták, a heptapeptid TT-232 és a peptidomimetikum J-2156 vegyületek hatásait endotoxinnal kiváltott akut és ovalbuminnal előidézett krónikus légúti gyulladásmodellekben.

I. 3. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A módszerek bemutatásakor csak az eredmények értelmezéséhez szükséges legfontosabb információkat ismertetem, a technikai részletek a megfelelő közleményekben megtalálhatók.

I. 3. 1. KÍSÉRLETI MODELLEK

Állatok

Kísérleteinket CD1, Balb/c, és C57Bl/6 egereken, továbbá C57Bl/6 törzsből előállított TRPV1 receptor knockout (TRPV1 KO; TRPV1^{-/-}) egereken és azok vad típusú kontrolljain (WT), valamint sst₄ receptor génhiányos egereken (sst₄^{-/-}) és sst₄^{+/+} megfelelőiken végeztük. A TRPV1^{-/-} egerek tenyészpárjait a Jackson Laboratories Ltd.-től, a C57Bl/6 és Balb/c egereket a Charles-River Hungary Kft.-től vásároltuk. Az sst₄^{+/+} egereket Dr. Piers Emsontól kaptuk (Laboratory of Molecular Neuroscience, The Babraham Institute, Cambridge, UK). Az egereket intézetünk állatházában vagy a PTE ÁOK Központi Állatházában szaporítottuk standard patogénmentes körülmények között. Minden kísérleti eljárás és vizsgálat megfelelt a Helsinki Nyilatkozatban foglalt ajánlásoknak és eleget tett az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998 (XII. 31.) számú kormányrendelet előírásainak. A kísérleti protokollokat a PTE állatkísérletekkel foglalkozó Etikai Bizottsága engedélyezte (szám: BA02/2000-16-2006).

Endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladásmodell

Az endotoxin (lipopoliszacharid, LPS) a Gram negatív baktériumok sejtfalának alkotója, amely a környezetünkben is megtalálható, emiatt jelentős kockázati tényező asztmában (Lapa e Silva Jr et al. 2000; Thorne et al. 2005). Intranazálisan adott LPS tüdőben lokalizáltan vált ki gyulladásos reakciót anélkül, hogy más szervekben szisztémás károsodást okozna. Az LPS Toll-like receptoron keresztül aktiválja a makrofágokat (Lapa e Silva Jr et al. 2000), melynek hatására gyulladásos citokinek (IL-1 β , TNF- α) szabadulnak fel. Ezek más mediátorokkal együtt neutrofil beáramlással, perivaszkuláris/peribronchiális ödémaképződéssel és a nyáktermelő kehelysejtek felszaporodásával jellemzhető gyulladást okoznak (Chignard és Balloy 2000; Savov et al. 2002). A szubakut légúti gyulladást éteres altatásban 60 μ l (167 μ g/ml) E. coli (083 szerotípus) LPS intranazális alkalmazásával váltottuk ki 24 órával a légúti hiperreaktivitás mértékének meghatározása előtt. A kontroll csoportokban az LPS helyett azonos térfogatú foszfát pufferrel kiegészített fiziológiás sóoldatot (PBS) alkalmaztunk.

Ovalbuminnal kiváltott krónikus légúti gyulladásmodell

Az asztma modellben Balb/c egereket az 1. és a 14. napon 20 µg i.p. ovalbuminnal (OVA) szenzitizáltunk (100 µl). Az első szenzitizáló injekciót követően a 28., 29. és a 30. napon 5%-os OVA-oldat 20 perces inhaláltatásával (4 ml/5 állat, 0.2 ml/perc) váltottuk ki a légúti gyulladást. A szenzitizáció során az OVA immunválaszt indukál, amelyben a Th₂-limfociták száma megemelkedik, citokin termelésük fokozódik és OVA-specifikus IgE antitestek termelődnek. A gyulladást granulocita-, elsősorban eozinofil-infiltráció, fokozott nyáktermelés és a légutak válaszkészségének fokozódása jellemzi (Penn et al. 2007).

Előkezelések, kezelések

a.) A kapszaicin-érzékeny idegvégződés szerepének vizsgálatára egy C57Bl/6 egércsoportot a TRPV1 receptor agonista RTX-szel kezeltünk elő (30, 70, 100 µg/kg s.c. 3 egymást követő napon), amely ezen érzőideg-végződések hónapokig tartó károsodását okozza (deszenzibilizáció, Jancsó et al. 1967). Az akut izgató hatások (fokozott nyákszekréció, hörgőgörcs, légzésleállás) kivédésére atropint, teofillint és terbutalint tartalmazó koktélt kaptak az állatok. Az RTX-előkezelés sikerességének ellenőrzésére 7-14 nap múlva, a kísérlet előtt 50 µl 0.1%-os kapszaicint cseppentettünk a szembe. A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések károsodása után ez a kémiai inger nem vált ki törlő mozdulatot („wiping teszt”, Welk et al. 1984), minden előkezelt állatban hiányzott ez a reakció (Szołcsányi et al. 1990).

b.) Más csoportokat 160 µg/kg s.c NK₁ receptor antagonistával (SR140333), NK₂ receptor antagonistával (SR48968), illetve CGRP1 receptor antagonistával (CGRP(8-37)) kezeltünk háromszor, 30 perccel az LPS beadása előtt, illetve 8 és 23 órával utána.

c.) A TRPV1 receptor-aktivációval felszabaduló SOM hatásának gátlására a szomatosztatin receptor antagonistá ciklo-szomatosztatinnal (C-SOM; 250 µg/kg i.p.) kezeltük a TRPV1^{+/+} egereket. Az exogén SOM hatásának vizsgálata céljából mindkét állatcsoportban szomatosztatin-14 (SOM-14; 100 µg/kg i.p.) kezelést végeztünk 30 perccel az LPS beadás előtt, majd háromszor a 24 órás kísérleti periódus alatt.

d.) A negyedik kísérletsorozatban a két sst₄ receptor agonista vegyületet (TT-232, J-2156; 500 µg/kg i.p.) adtuk mindkét modellben a légzésfunkciós mérés előtt 30 perccel. Amikor a vegyületek gyulladáshoz vezető folyamatokra kifejtett hatását is vizsgálni kívántuk, a szubakut modellben 30 perccel az endotoxin beadása előtt, majd 8 és 24 órával később, a krónikus modellben az OVA-inhalációval párhuzamosan, mindhárom napon az inhaláltatás előtt 30 perccel, majd 6 és 12 órával később, valamint a mérés előtt 30 perccel adtuk őket.

Emberi tüdőminták

Az sst₄ receptor expressziójának emberi tüdőben történő meghatározásához a mintákat hat tüdőtumor miatt operált betegből egyetemünk Sebészeti Klinikájával való együttműködésünk keretein belül kaptuk. A tumor eltávolítása a makroszkóposan ép területekben történt, ezért az egyik minta ebből az intakt tüdőrészből, a másik minta a térfoglaló folyamat környezetében lévő gyulladt szövetből származott. Minden mintapár ép és gyulladt voltát a makroszkópos vizsgálat mellett szövettani vizsgálattal is alátámasztottuk. A mintavételt és a vizsgálatokat a PTE ÁOK Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: 3316), a betegektől szóbeli és írásbeli tájékoztatást követően aláírt beleegyező nyilatkozattal rendelkezünk.

I. 3. 2. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Légzésfunkciós változások mérése

A légzésfunkciós változásokat 24 órával az LPS-kezelést követően, illetve ovalbuminos kezelés esetén a 32. napon, Buxco teljes test pletizmográfval (Buxco Europe Ltd., *I/1. ábra*) éber, szabadon mozgó állatokon mértük. A hörgőgörcsöt a muszkarin receptor agonista carbachol (50 µl/egér; 5.5; 11; 22 mM) növekvő koncentrációinak másfél perces inhaláltatásával váltottuk ki. Az inhaláltatást koncentrációnként 15-15 perces mérési periódus követte, melynek végére a megfigyelt paraméterek visszatértek az alaphelyzetbe.

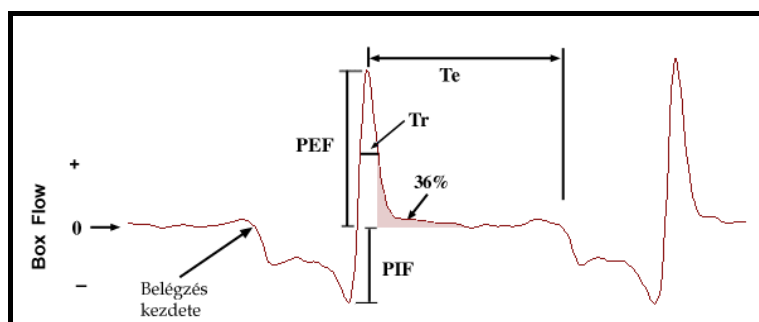


**I/1. ábra. Éber egerek bronchiális reaktivitásának mérése
Buxco teljes test pletizmográf készülékkel**

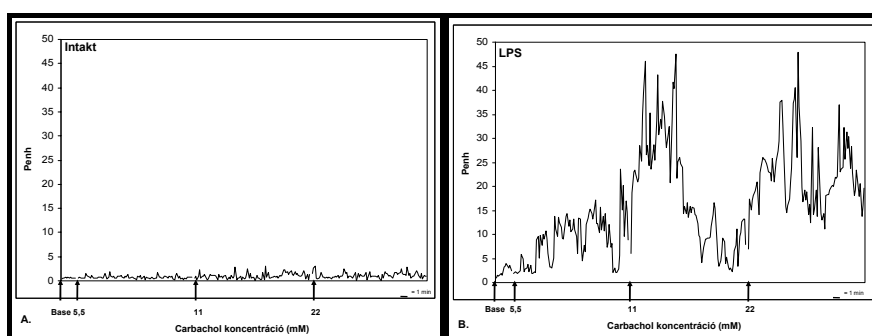
A vizsgált paraméter a légúti ellenállással egyenesen arányos Penh (enhanced pause) (I/2.,3.

ábrák), amely a következő képlet alapján számított érték:
$$\text{Penh} = \left(\frac{t_e}{t_r} - 1 \right) \left(\frac{\text{PEF}}{\text{PIF}} \right)$$

Ahol t_e a kilégzési, t_r a relaxációs idő; PEF a kilégzés, PIF pedig a belégzés alatti maximális áramlás (I/2. ábra). Minden stimulusra az alapvonal feletti százalékos változásokat számoltuk.



I/2. ábra. Penh képletében szereplő változók



I/3. ábra. Penh regisztrátumok. (A) Egy intakt és (B) egy LPS-sel kezelt C57Bl/6 egér Penh görbéinek változása carbachol növekvő koncentrációinak inhalációja következtében.

Mivel a Penh mérésére és a légúti ellenállással való kapcsolatára vonatkozóan az irodalom ellentmondásos, altatott, tracheotomizált és mesterségesen egerekben direkt módon is megmértük a légúti ellenállást ($RI: \Delta \text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{sec/ml}$). A tracheába kanült vezettünk, amelyet szorosan rögzítettünk és egy kétágú csatlakozót kapcsolunk hozzá. A lélegeztető készülék (MiniVent Type 845, Hugo Sachs Electronic, Harvard Apparatus) belégzési és kilégzési oldalát ehhez csatlakoztattuk. Az áramlási volumenek digitális differenciálásával folyamatosan mértük a légúti ellenállást (RI). A carbachol aeroszolt az éber mérésel azonos protokoll szerint, közvetlenül a tracheába porlasztottuk. Minden carbachol-stimulusra az alapvonal feletti százalékos RI változásokat számoltuk. Ezzel a kísérlettel bizonyítottuk, hogy a Penh mértékének változása valóban az alsó légutak hiperreaktivitását mutatja.

A légzésfunkciós méréseket követően az állatokat ketamin (100 mg/kg i.p.) és xylazin (10 mg/kg i.m.) kombinációjával történő mély altatásban leöltük. A plazma SOM-szerű immunreaktivitás meghatározására a második kísérletsorozatban a kísérlet végén szívpunkcióval vért vettünk. A tüdőt kimetszettük, az egyik felület 4%-os pufferolt formaldehyd-be helyeztük szövettani feldolgozás céljából. A másik felület két darabba vágtuk, a nedves tömeg lemérése után folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk neuropeptid, mieloperoxidáz (MPO) és citokin meghatározása céljából. A harmadik kísérletsorozatban a szomatosztatin sst₄ receptor meghatározásához 1-1 kis tüdőmintát RNA-later oldatban és speciális western blot pufferben is tároltunk -80°C-on.

Szövettani vizsgálatok és szemikvantitatív morfológiai értékelés

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott tüdőmintákból 5-7 µm vastag metszeteket készítettünk és hematoxin-eozinnal (HE), illetve a nyáktermelő sejtek láthatóvá tételéhez perjódsv-Schiff (PAS) reagenssel festettük. A szemikvantitatív pontrendszer alapján történő értékelést patológus kolléga végezte. Az LPS-sel kiváltott gyulladásban a szempontok a *perivaszkuláris ödéma* (0-3), *perivaszkuláris/peribronchiális granulocita-infiltráció* (0-3), *nyáktermelő kehelysejtek (goblet-sejtek) hiperpláziája* (0-2) és *alveoláris makrofág infiltráció* (0-2) voltak (Zeldin et al. 2001; Helyes et al. 2007; Elekes et al. 2007, 2008). Az ovalbumin-indukálta asztma modellben *az eozinofil sejtek peribronchiális/perivaszkuláris terekbe történő infiltrációja* (0-4), *nyálkahártya-ödéma/nyáktermelés* (0-3) és *hámsejtek károsodása* (0-3) alapján értékeltünk (Underwood et al. 1995; Xie et al. 2002; Elekes et al. 2008).

Szenzoros neuropeptidek kvantitatív meghatározása tüdőszövetből és plazmából

A tüdőhomogenizátumokat centrifugáltuk, az üledékből MPO-aktivitást, a felülúszóból radioimmunoassay-vel (RIA) SP-, CGRP- és SOM-szerű immunreaktivitást (IR) határoztunk meg. E specifikus és érzékeny RIA módszereket intézetünkben fejlesztette ki Dr. Németh József kollégám (Németh et al. 1996, 1998, 1999). A plazma SOM-IR meghatározására a vért EDTA-t és peptidázgátló aprotinint tartalmazó csövekbe tettük. Tömény alkohol hatására a plazmafehérjék kicsapódnak, a peptidek azonban oldatban maradnak. Centrifugálást követően a peptideket tartalmazó felülúszót nitrogéngáz alatt bepároltuk, majd RIA pufferben visszaoldottuk (Németh et al. 1996, 1998, 1999; Elekes et al. 2007).

Mieloperoxidáz aktivitás mérése a tüdőben

A makrofágok és a granulociták felhalmozódásának kvantitatív meghatározásához fenil-metilszulfonil-fluorid (PMSF és PMSF) pufferben homogenizált tüdőmintából MPO-aktivitást mértünk. A módszer H_2O_2 -3,3',5,5'-tetrametil-benzidin (TMB/ H_2O_2) reagenssel történő színreakción alapul, az optikai denzitást 620 nm-en mértük, az eredményeket humán MPO preparátum standard görbéje alapján értékeltük.

Gyulladásos citokinek kvantitatív meghatározása

A homogenizált tüdőmintákból a gyulladásos citokinek, IL-1 β és egyes kísérletekben a TNF- α , koncentrációját specifikus ELISA módszerekkel (OptEIA szettek, BD Biosciences) határoztuk meg. A pufferek elkészítése, az összemérés és a standard sor összeállítása az eljárási protokollnak megfelelően történt. A szubsztrát tetrametil-benzidin volt, az optikai denzitást 450 nm-en mértük Multiskan readerrel (Labsystems). A koncentrációkat pg/g nedves szövet egységben a standard sor alapján adtuk meg.

Az sst₄ receptor mRNS meghatározása tüdőben

Az egér és emberi tüdőmintákat is 1 ml RNA-later oldatban -80°C-on tároltuk. A teljes RNS tartalom izolálásához TriReagent Mammalian Total RNA Miniprep Kit-et és proteináz K-t használtunk a gyártó utasításai szerint. Az RNS mennyiségét és tisztaságát spektrofotometrián és elektroforézissel határoztuk meg. Az sst₄ receptor mRNS-t extraháltuk, cDNS-re írtuk át és TaqMan kvantitatív valós idejű reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció (qRT-PCR) esszéssel határoztuk meg ABI7500 rendszerben (egér sst₄: Mm00436710_s1; emberi sst₄: Hs012566620_s1). A reakciót a mintákból izolált teljes RNS tartalom felező hígítási sorának segítségével kalibráltuk és standard görbéket készítettünk. Az értékelés QuantityOne szoftverrel (BioRad) történt. Az sst₄ receptor és a háztartási génként szolgáló 18S riboszómális RNS transzkripció szintjeinek meghatározásához a Ct értékeket közvetlenül hasonlítottuk össze. A Ct érték, amely azon ciklusok számát jelenti, amely egy specifikus küszöbön vonatkoztatott fluoreszcens jel eléréséhez szükséges a detektoron, fordítottan arányos a reakcióban részt vevő templát nukleinsavszekvenciák mennyiségével.

Az sst₄ receptor fehérje kvantitatív meghatározása tüdőben

Az egér tüdőmintákat proteázgátló koktél tartalmazó lízispufferben homogenizáltuk. A teljes sejtlizátumot nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE)

megfuttattuk, majd BioRad MiniProtein készülék nedves transzfer rendszere segítségével nitrocellulóz membránra vittük át. A nem-specifikus kötődés megakadályozására a blotokat blokkoló pufferben áztattuk, majd 2 órán át 500x-os hígítású elsődleges antitesttel (kecske poliklonális-sst₄ antitest; Santa Cruz) inkubáltuk, majd háromszor 5-5 percig mostuk. A primér antitest kötődését HRP-konjugált számból származó kecske-ellenes IgG-vel detektáltuk. A western blot reakciókat erősített kemilumineszcens módszerrel (SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate) hívtuk elő a gyártó utasításainak megfelelően és XAR-5 röntgen filmmel fényképeztük. A felvitt fehérjék azonos mennyiségének ellenőrzésére monoklonális egér anti- β -aktin antitestet és HRP-konjugált kecske egér-ellenes IgG-t használtunk. A blotokat denzitometrálas után QuantityOne szoftverrel analizáltuk.

Az sst₄ receptor fehérje immunlokalizációja a tüdőben

A formalinban fixált tüdőmintákat paraffinba ágyasztuk és 5-7 μ m metszeteket készítettünk. Az antigéneket savas (pH 6) citrát-pufferben inkubálással mikrohullámú sütőben tártuk fel. A szövet endogén peroxidáz aktivitását H₂O₂ inkubációval gátoltuk. A nem-specifikusan kötődő másodlagos antitestek kapcsolódását normál kecske szérummal történő előinkubálással előztük meg. A metszeteket 1:50 nyúl poliklonális anti-sst₄ antitestekkel (egér: Alomone Labsystems; emberi: MBL) inkubáltuk, majd torna peroxidázzal (HRP)-konjugált En Vision rendszerű anti-nyúl másodlagos antitestekkel (Dako-Cytomation) továbbkezeltük. Végül az sst₄ receptor immunlokalizációját diaminobenzidin (DAB) reakcióval tettük láthatóvá, a magfestést hematoxilinnal végeztük. A specifikus jelölés igazolására elsődleges antitest nélküli metszeteket készítettünk, ahol immunpozitivitás nem volt látható. Az értékelést a tüdő szövettanában nagy tapasztalattal rendelkező patológus kolléga végezte.

Statisztikai értékelés

Minden kísérleti adat csoportonként 8-14 egér átlagát mutatja az átlag standard hibájával (\pm SEM). A Penh, MPO, szenzoros neuropeptid és citokin eredmények statisztikai értékelésére egyutas variancia analízist (ANOVA), majd Bonferroni-féle módosított t-tesztet használtunk. A PCR és WB denzitometriás adatokat Student-féle páratlan t-teszttel hasonlítottuk össze. A szemikvantitativ szövettani értékeléssel meghatározott pontszámokat box plot módszerrel ábrázoltuk, ahol az egyes oszlopok a csoportok statisztikai középvértékét (median) \pm 25-75 percentilértéket mutatják, a függőleges vonalak pedig a maximum-minimum értékekre vonatkoznak. A statisztikai értékelésre ebben az esetben Kruskal-Wallis próbát (nem parametrikus ANOVA), majd Dunn-féle poszt tesztet használtunk.

I. 4. EREDMÉNYEK

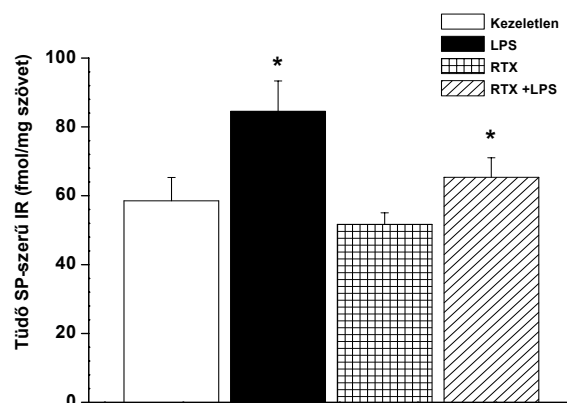
I. 4. 1. Fejezet: A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY ÉRZŐIDEG-VÉGZŐDÉSEK ÉS A GYULLADÁSKELTŐ SZENZOROS NEUROPEPTIDEK SZEREPE AKUT LÉGÚTI GYULLADÁSBAN

A tüdő SP és CGRP koncentrációjának változása LPS-sel kiváltott gyulladás hatására

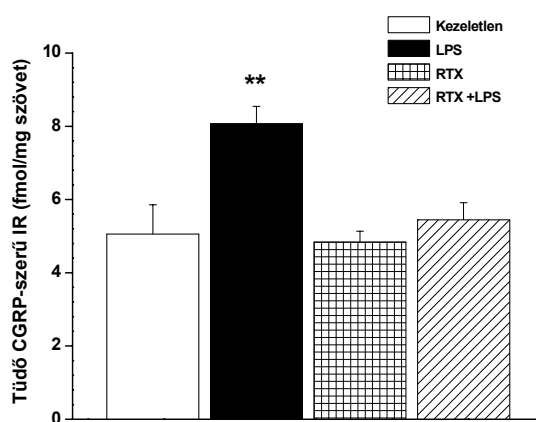
A homogenizált tüdőmintákban a RIA-val meghatározott SP- és CGRP-szerű immunreaktivitás szignifikánsan növekedett LPS intranazális adása után 25 órával. Ezt a 30%-os emelkedést a kapszaicin-szenzitív érzőideg-végződés RTX-előkezeléssel történő inaktiválása mindkét peptid esetében kivédte, ami arra utal, hogy a gyulladt tüdőben a SP és a CGRP ezen afferensekből szabadul fel. A nem gyulladt tüdőminták peptidtartalma között nem volt különbség az RTX-szel előkezelt és előkezeletlen egerekben (*I/4. ábra*).

Légzésfunkciós változások

A muszkarin receptor agonista carbachol növekvő koncentrációinak belélegzése (5.5–22 mM) koncentrációfüggő bronchokonstriktiót idézett elő. A PBS-sel kezelt kontroll csoporttal összehasonlítva 24 órával az intranazális LPS-adást követően a carbachol hatására történő Penh és RI növekedés is szignifikánsan nagyobb volt, amely azt igazolja, hogy gyulladásos bronchiális hiperreaktivitás alakult ki. Ezek az eredmények azt is bizonyítják, hogy a Penh változásai jól korrelálnak az RI változásokkal és a carbachol-kiváltotta Penh-növekedés elsősorban a bronchokonstriktiónak köszönhető, a nazális ellenállásfokozódás nem járul ehhez hozzá jelentős mértékben (*I/1. táblázat*). A légúti hiperreaktivitás a legmagasabb carbachol koncentráció esetén teljesen megszűnt az RTX-szel előkezelt egerekben, de kisebb koncentrációknál is 70-80%-ban alacsonyabb volt, mint az előkezeletlen csoportokban. Az NK₁ receptor antagonist SR140333, vagy a CGRP1 receptor antagonist CGRP(8-37) kezelés nem befolyásolta a hiperreaktivitás mértékét, az NK₂ antagonist SR48968 azonban szignifikáns (kb. 35-50%-os) gátlást idézett elő, amely a két tachikinin receptor antagonist kombinációjával történő kezelés után is hasonlóan bizonyult (*I/5. ábra*).



A

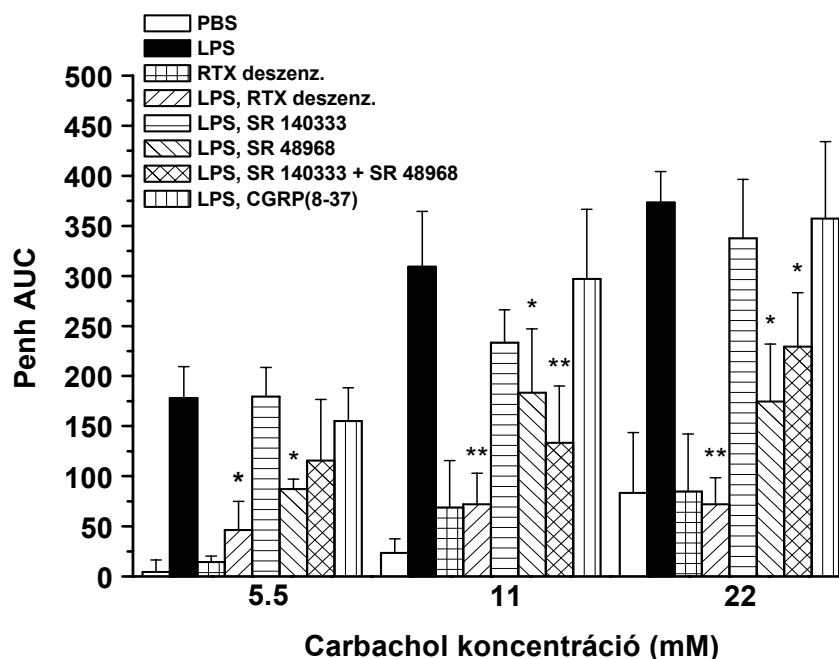


B

I/4. ábra. (A) SP- és (B) CGRP-szerű immunreaktivitás változása a tüdőben endotoxin intranazális adásának hatására, előkezeletlen és RTX-előkezelt egerekben (átlag±SEM; *p<0.05 és **p<0.01 vs. LPS-kezelés).

Paraméter	Carbachol koncentráció			
	NaCl	5.5 mM	11 mM	22 mM
Penh változás (%)				
Kezeletlen	3.2±0.7	14.2±1.3	53.9±4.5	146.3±10.9
LPS	8.5±1.3 *	58.5±9.3 **	126.77±3.3 **	282.31±14.4 *
Rl változás (%)				
Kezeletlen	5.5±0.4	15.5±3.22	67.7±20.6	153.1±25.2
LPS	9.2±0.9 *	63.8±19.5 **	192.6±34.8 **	410.1±79.4 **

I/1. táblázat. Az átlag Penh és az átlag direkt légúti ellenállás (Rl) változásai. Az adatokat a megfelelő alapértékekre normalizáltuk: [(adott carbachol koncentrációnál mért válasz-a megfelelő alapérték)/a megfelelő alapérték]x100; átlag±SEM; *p<0.05, **p<0.01 vs. LPS-kezelt csoport)

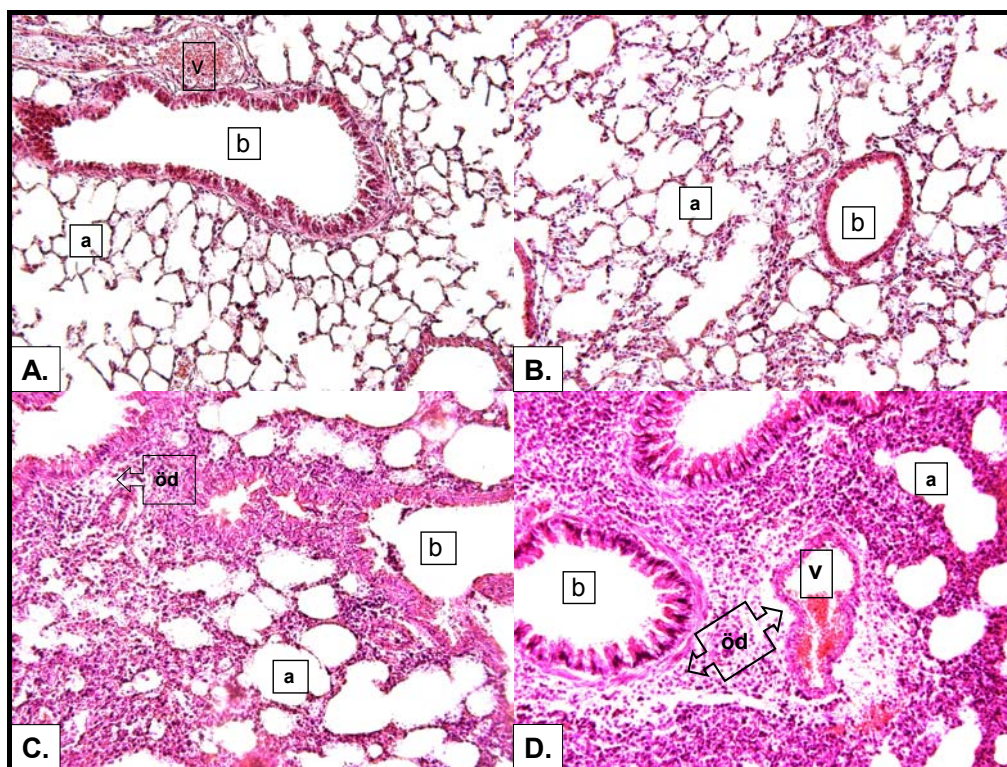


I/5. ábra. LPS-sel kiváltott gyulladásos légúti hiperreaktivitás. Az oszlopok a Penh görbék alatti területeket (AUC) mutatják az NaCl inhalálásával nyert alapértékek levonása után (átlag±SEM, * $p<0.05$ és ** $p<0.01$ vs. LPS-kezelés).

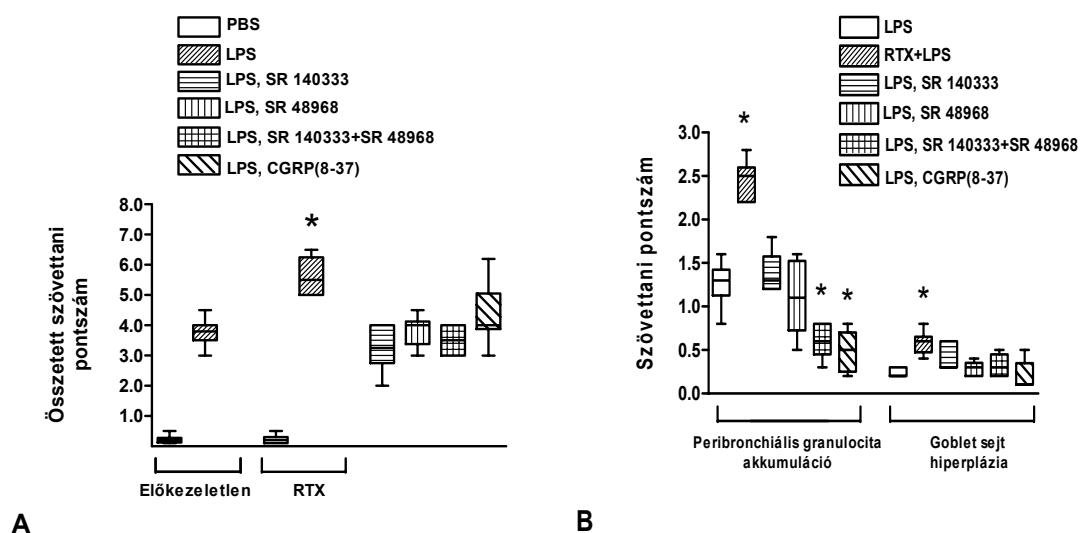
Szövettani vizsgálatok és pontozás

Az intranazális LPS peribronchioláris/perivaszkuláris ödémát, intersticiális granulocita-felhalmozódást, az alveoláris terekbe mononukleáris sejtek (elsősorban makrofágok) invázióját, és a nyáktermelő kehelysejtek (goblet-sejtek) felszaporodását idézi elő (**I/6. ábra**). Ezekből a paraméterekből számított összetett gyulladás pontszámok jelentősen magasabbak voltak az RTX-szel előkezelt egerekben (**I/7. A. ábra**). Bár az RTX-deszenzitizáció után az ödéma és a makrofágok infiltrációja nem változott, a kehelysejtek száma és a peribronchiális granulociták mennyisége jelentősen megnövekedett (**I/7. B. ábra**).

Sem az NK₁ receptor antagonistá SR140333-nak, sem az NK₂ receptor antagonistá SR48968-nak nem volt hatása egyik endotoxin-kiváltotta gyulladásos paraméterre sem. Azonban e kettő kombinációja vagy a CGRP1 receptor antagonistá CGRP(8-37) szignifikánsan csökkentette a bronchiolusok körül felhalmozódott granulociták számát. Egyik antagonistával történő kezelés sem befolyásolta az ödéma képződését, a mononukleáris sejtek alveoláris terekbe történő áramlását és a kehelysejtek hiperpláziáját. Az adatok azt jelzik, hogy az LPS-indukálta légúti gyulladásmodellben a neurogén gyulladást közvetítő szenzoros neuropeptidek nem játszanak meghatározó szerepet a gyulladásos szövettani változásokban (**I/7. A. ábra**).



I/6. ábra. Szövettani metszetek, melyek bemutatják (A) intranazális PBS-sel kezelt egér, (B) RTX-deszenzitizált PBS-sel kezelt egér, (C) LPS-kezelt egér, és (D) RTX-deszenzitizált LPS-sel kezelt egér tüdejét. HE festés, 200x-os nagyítás; [a]: alveolus, [b]: bronchiolus, [v]: ér, [öd]: ödéma.



I/7. ábra. Az LPS-sel kiváltott tüdőbeli gyulladásos változások (A) összetett és (B) részletes szemikvantitatív szövettani értékelése. A box plot ábrázolással minden négyszög az adott csoport eredményeinek mediánját (statistikai közepét) mutatja a 25 és 75 percentil értékekkel, a függőleges vonalak a maximum és minimum értékekre vonatkoznak; * $p < 0.05$ vs. LPS-kezelt csoport.

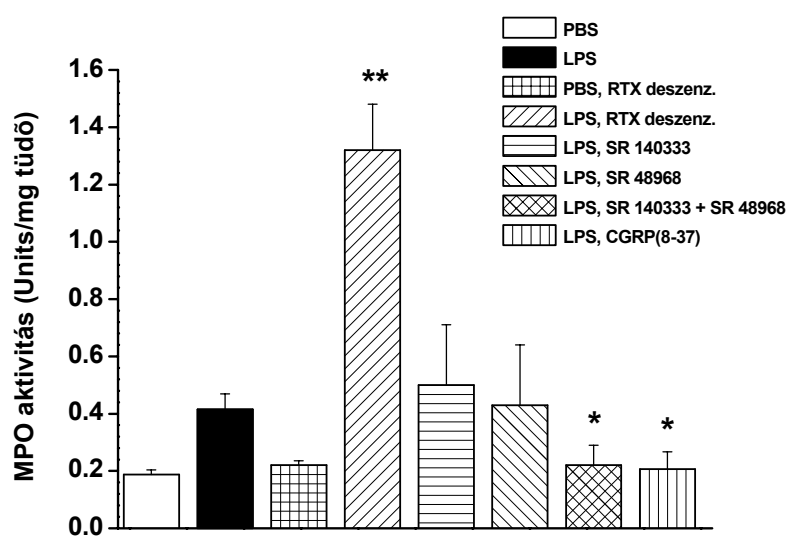
Mieloperoxidáz aktivitás változása a tüdőben

Az akkumulálódott granulociták és makrofágok mennyiségét jelző MPO-aktivitás a PBS-sel kezelt egerek nem gyulladt tüdejéhez viszonyítva kétszeresére emelkedett 25 órával az

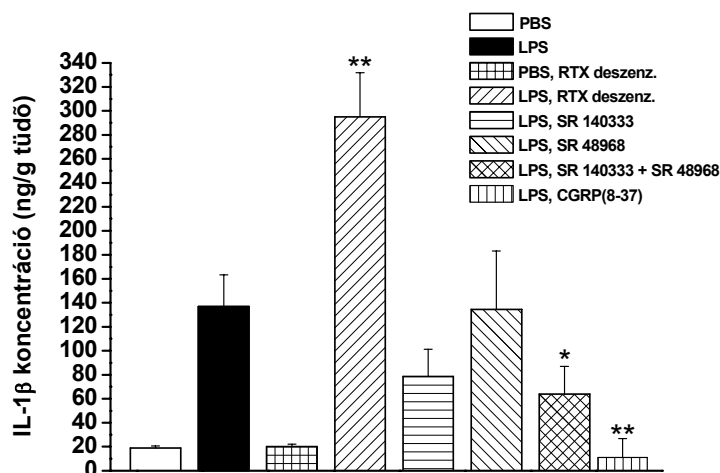
intranazális LPS-kezelés után. RTX-előkezelést követően azonban LPS hatására ennél is szignifikánsan nagyobb, mintegy háromszoros növekedést tapasztaltunk. Sem az NK₁ receptor antagonistája, sem az NK₂ receptor antagonistája önmagában nem változtatta meg az LPS-sel kiváltott MPO-aktivitás-növekedést, azonban a CGRP1 receptor blokkolása, valamint az SR140333 és SR48968 kombinációja szignifikánsan csökkentette (**I/8. ábra**).

IL-1 β koncentrációjának változása a tüdőben

Az LPS-kezelés a gyulladásos citokin IL-1 β tüdőbeli koncentrációjának több, mint 7-szeres növekedését idézte elő, ami RTX-szel előkezelt egerekben szignifikánsan magasabb volt. Sem az NK₁ antagonistája SR140333, sem az NK₂ antagonistája SR48968 önmagában nem befolyásolta szignifikánsan az endotoxin-kiváltotta IL-1 β -emelkedést, kombinációjuk ezzel szemben 53%-os gátlást eredményezett. Figyelemreméltó továbbá, hogy a CGRP1 receptor antagonistája CGRP(8-37) teljesen kivédte az LPS-indukálta IL-1 β -szintézist (**I/9. ábra**).



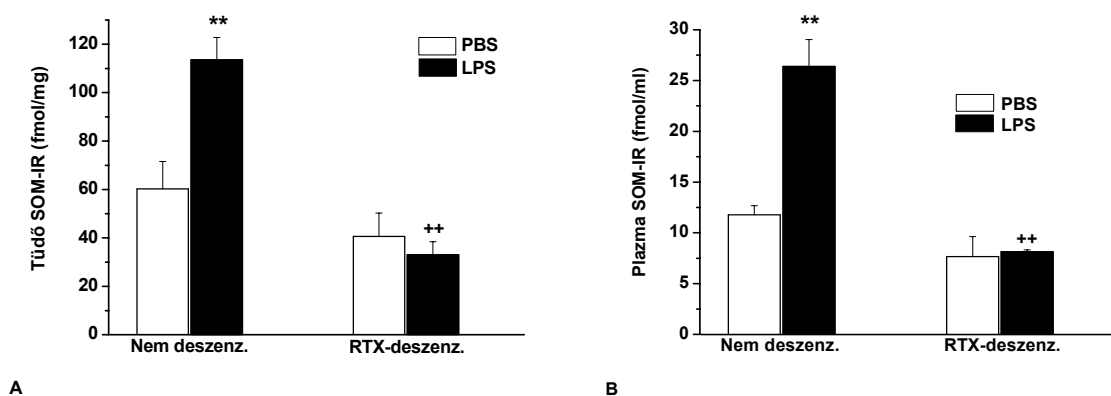
I/8. ábra. A tüdőminták mieloperoxidáz aktivitása. Az oszlopok átlagértékeket \pm SEM ábrázolják; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. LPS-kezelt csoport.



I/9. ábra. A tüdőminták IL-1 β koncentrációja. Az eredmények az átlagértékeket \pm SEM ábrázolják; * p <0.05, **<0.01 vs. LPS-kezelt csoport.

A tüdő szomatosztatin koncentrációjának változása LPS-sel kiváltott gyulladás hatására

A szomatosztatin-szerű immunreaktivitás alapszintje körülbelül négy-öttször magasabb a tüdőben, mint a plazmában. Előkezeletlen egerekben az intranazális LPS-adás 25 óra múlva a tüdő és a plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitásának kétszeres emelkedését idézte elő. Ezt a növekedés a kapszaicin-szenzitív afferensek RTX-előkezeléssel történő inaktiválása gátolta. A nem gyulladt tüdő szomatosztatin tartalma az RTX-deszenzitizáció után enyhe, nem szignifikáns csökkenést mutatott (I/10. A.,B. ábra).

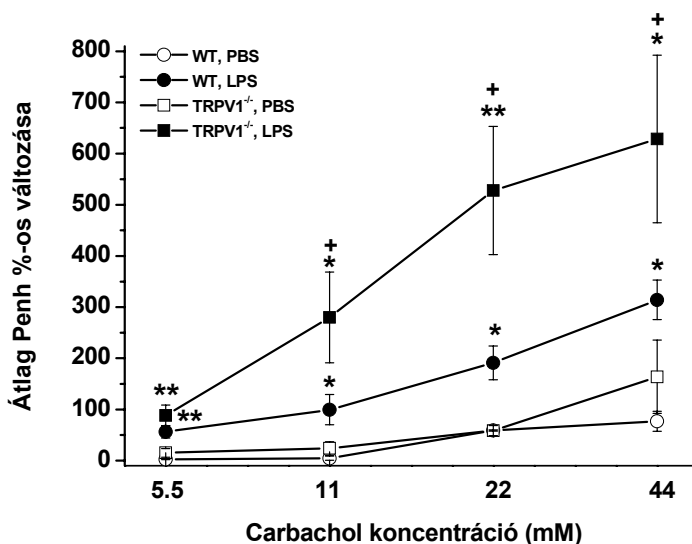


I/10. ábra. A szomatosztatin-szerű immunreaktivitás (SOM-IR) (A) a tüdőben és (B) a plazmában (átlag \pm SEM; ** p <0.01 vs. PBS-sel kezelt csoport; ++ p <0.01 vs. nem-deszenzitizált állatok).

I. 4. 2. Fejezet: A TRPV1 RECEPTOR SZEREPE AKUT LÉGÚTI GYULLADÁSBAN

Gyulladásos légúti hiperreaktivitás C57Bl/6 vad típusú (WT) és TRPV1^{-/-} egerekben

Az alap Penh és légúti ellenállás (Rl) értékek mindkét állatcsoportban jelentősen megnövekedtek az intranazális LPS-kezelés után a PBS-sel kezelt egerekkel összehasonlítva: WT egerekben 2.42 ± 0.43 vs 0.85 ± 0.08 (átlag Penh \pm SEM) és 3.23 ± 0.45 vs. 0.69 ± 0.06 (átlag Rl \pm SEM), TRPV1^{-/-} egerekben 2.41 ± 0.67 vs. 0.95 ± 0.15 (átlag Penh \pm SEM) és 2.69 ± 0.23 vs. 0.86 ± 0.09 (átlag Rl \pm SEM). A Penh és Rl alapérték feletti növekedése szignifikánsan nagyobb volt az LPS-kezelt csoportokban, ami a gyulladásos bronchiális hiperreaktivitás kialakulását igazolta. Ezek az eredmények az előző kísérletsorozatban tapasztaltakhoz hasonlóan bizonyítékokat szolgáltatott arra, hogy a számított Penh paraméter és a közvetlen légúti ellenállás változásai ebben a modellben jól korrelálnak egymással. Jelentős különbség nem volt a carbachollal kiváltott válaszok között a két PBS-kezelt csoportban. LPS-kezelt TRPV1^{-/-} egerekben a maximális Penh értékek magasabbak voltak és a bronchokonstriktió időtartama hosszabb volt, ezért az átlag Penh alapvonal feletti növekedése mindhárom carbachol koncentráció esetén szignifikánsan nagyobb volt, mint vad típusúakban (I/11. ábra).

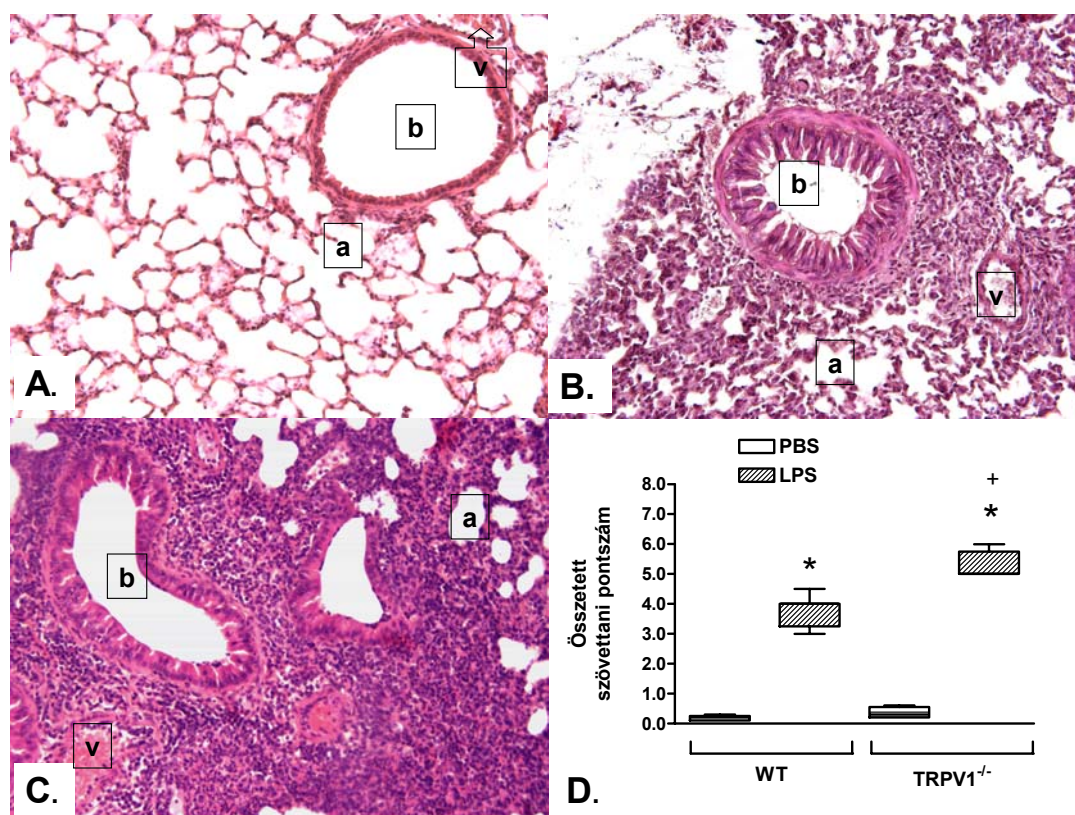


I/11. ábra. Endotoxinnal kiváltott gyulladásos légúti hiperreaktivitás (átlag \pm SEM, * $p < 0.05$ és ** $p < 0.01$ vs. LPS-kezelt megfelelő csoport; + $p < 0.05$ vs. WT).

Endotoxinnal kiváltott gyulladásos változások WT és TRPV1^{-/-} egerek tüdejében

A szövettani vizsgálatok és a szemikvantitatív pontozás azt mutatták, hogy az LPS-sel kiváltott peribronchiális/perivaszkuláris ödéma, a bronchiolusok körüli granulocita-

felhalmozódás, a mononukleáris sejtek alveoláris terekbe történő beáramlása és a nyáktermelő kehelysejtek hiperpláziája súlyosabb volt a TRPV1 receptor génhiányos egerekben, mint vad típusú kontrolljaikban (*I/12. ábra*).



I/12. ábra. A tüdőminták szövettani vizsgálata. LPS-sel kiváltott gyulladásos szövettani elváltozások (B) WT és (C) TRPV1^{-/-} egerek tüdőmintáiban összehasonlítva az (A) ép, PBS-sel kezelt tüdő szerkezetével. HE festés, 200x-os nagyítás; [a]: alveolus, [b]: bronchiolus, [v]: ér. (D) Szemikvantitatív szövettani értékelés, mely a perivaszkuláris ödémából, perivaszkuláris/peribronchioláris granulocita-felhalmozódásból, kehelysejt-hiperpláziából és a mononukleáris sejtek alveoláris térbe való infiltrációjából tevődik össze (statisztikai középértékek±maximális/minimális értékek; *p<0.01 vs. PBS-kezelt csoport, ⁺p<0.05 vs. WT).

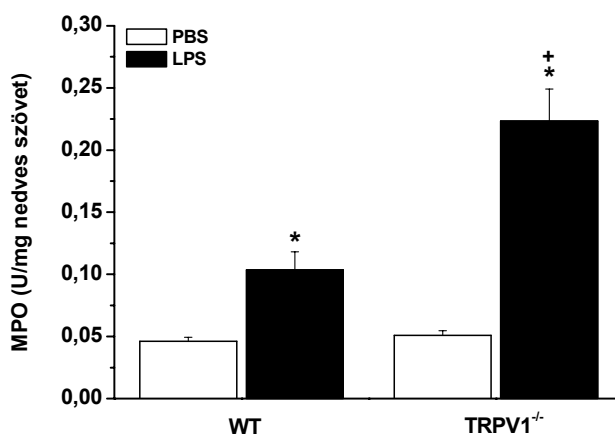
MPO aktivitás a tüdőben WT és TRPV1^{-/-} egerekben

WT egerek tüdejében az endotoxin-kezelés körülbelül kétszeres MPO-aktivitás-emelkedést idézett elő a PBS-sel kezelt csoporthoz viszonyítva. A TRPV1 receptor génhiányos állatokban ez az érték szignifikánsan nagyobb, csaknem négyszerese volt a megfelelő intakt csoportban mért aktivitásnak (*I/13. ábra*).

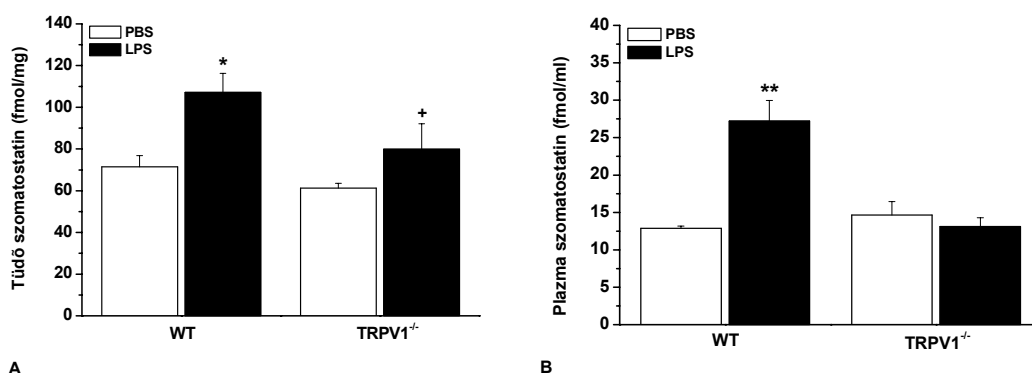
Szomatosztatin LPS-sel kiváltott koncentráció-változása a tüdőben és a plazmában

Az előző fejezetben bemutatotthoz hasonlóan itt is látható, hogy LPS-kezelés hatására a RIA-val meghatározott szomatosztatin-szerű immunreaktivitás a tüdőben és a plazmában is szignifikánsan növekedett WT egerekben. Ezzel szemben a TRPV1^{-/-} csoportban a SOM-szerű IR LPS-indukálta emelkedése a tüdőben sokkal kisebb mértékű volt, a plazmában pedig

teljesen elmaradt. Ezen eredményeink arra utaltak, hogy a SOM gyulladás során TRPV1 receptor aktivációval szabadul fel a tüdő kapszaicin-érzékeny rostjaiból és a szisztémás keringésbe kerül (*I/14. A.,B. ábra*).



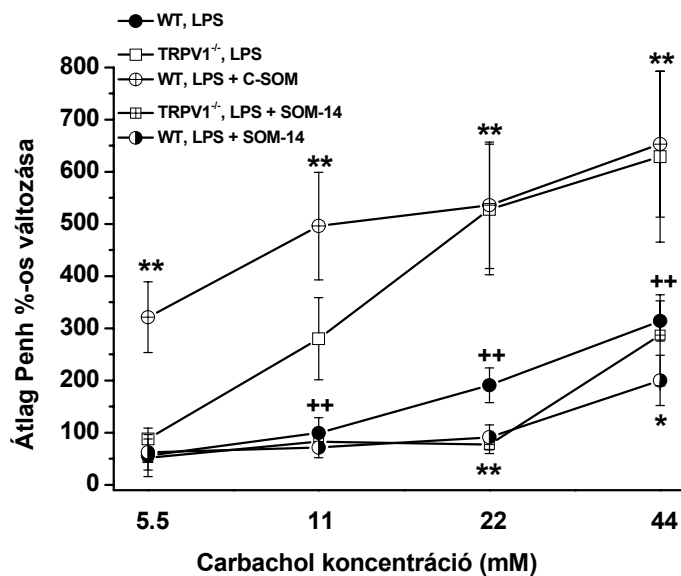
I/13. ábra. A tüdőminták MPO-aktivitása (átlag±SEM; *<0.01 vs. PBS, +p<0.01 vs. WT).



I/14. ábra. (A) tüdő és (B) plazma szomatostatin-szerű immunreaktivitása (SOM-IR). Az oszlopok átlag±SEM értékeket jeleznek; *p<0.05, **<0.01 vs. LPS-kezelt csoport és +p<0.05 vs. WT.

A szomatostatin szerepe az endotoxinnal kiváltott légúti hiperreaktivásban, gyulladásos szövettani elváltozásokban és a mieloperoxidáz aktivitásban

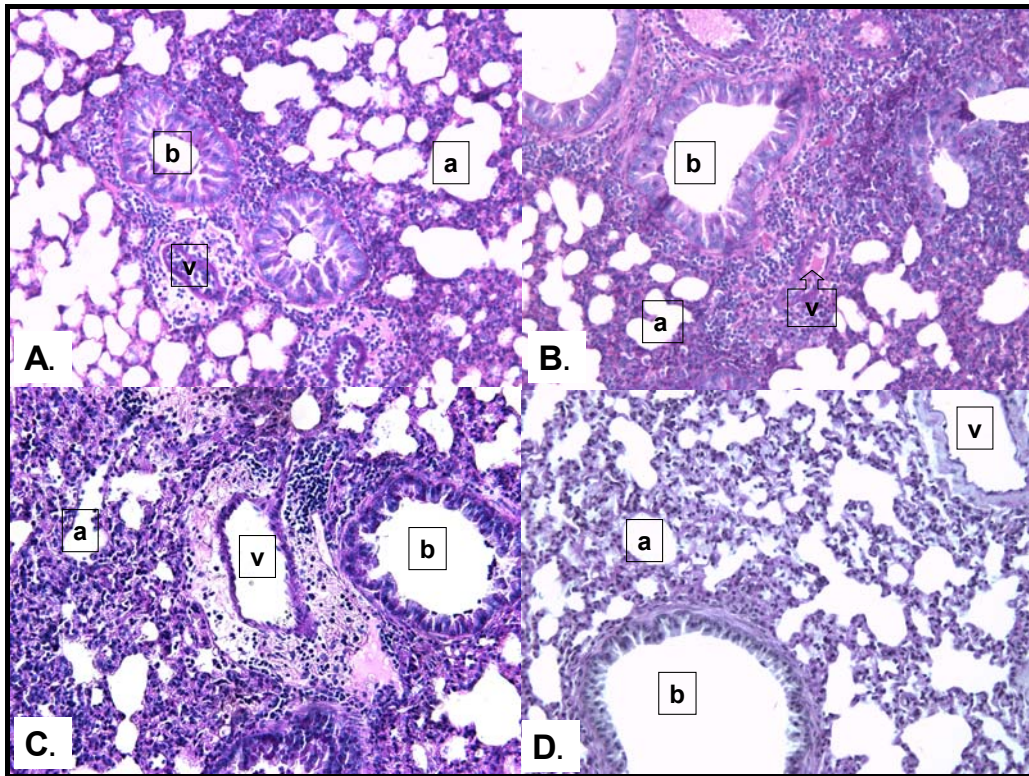
Ismételt SOM-14 kezelés a TRPV1^{-/-} és WT egerekben is szignifikánsan gátolta a carbachollal kiváltott bronchokonstriktációt, de a hatás mértéke a receptor génhiányos csoportban nagyobb volt. Emellett a WT egerekben a C-SOM, amely antagonizálja a szomatostatin hatásait mind az 5 receptor altípuson, jelentősen növelte a bronchiális hiperreaktivitást (*I/15. ábra*).



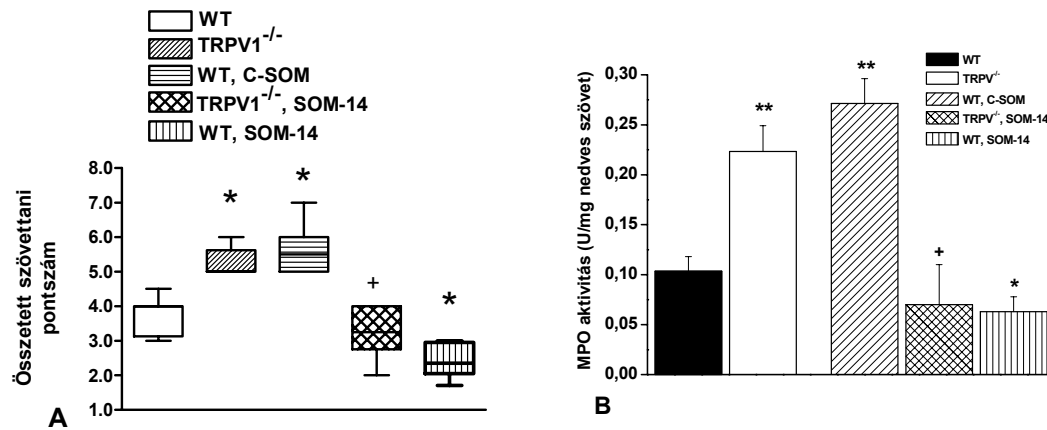
I/15. ábra. SOM-14 és C-SOM hatása az LPS által kiváltott gyulladásos légúti hiperreaktivásra WT és TRPV1^{-/-} egerekben (átlag±SEM; *p<0.05, **<0.01 vs WT, ++p<0.01 vs. TRPV1^{-/-}).

A SOM-14-kezelés szignifikánsan csökkentette az endotoxinnal kiváltott gyulladásos változásokat mind a TRPV1^{-/-}, mind a vad típusú egerek tüdejében, de a gátlás mértéke nagyobb volt a TRPV1 receptor génhiányos csoportban. A C-SOM injekció TRPV1^{+/+} állatokban súlyosbította e paramétereket, különösen a peribronchiális ödémát, a granulocita-infiltrációt és a kehelysejtek hiperpláziáját (I/16. ábra). A perivaszkuláris ödéma, granulocita-felhalmozódás, goblet-sejt felszaporodás, az alveoláris terekbe történő mononukleáris sejt beáramlása alapján számolt összetett gyulladáspontszám is ezt mutatja (I/17. A. ábra).

A szövettani eredményekkel összhangban a SOM-14 mindkét csoportban szignifikánsan csökkentette az LPS-sel kiváltott tüdőbeli MPO-aktivitás-növekedést, de a gátlás mértéke ennél a paraméternél is nagyobb volt a TRPV1^{-/-} egerek esetén. A WT csoportban az sst receptor antagonistával való kezelés több mint kétszeresére növelte az endotoxin hatására létrejött MPO-aktivitást (I/17. B. ábra). TRPV1^{-/-} egerek C-SOM-kezelése nem okozott változást sem az LPS-sel kiváltott gyulladásos paraméterekben, sem a bronchiális hiperreaktivásban. Intakt egerekben nem tapasztaltunk változást a carbachol-indukálta bronchokonstrikcióban, a szövettani paraméterekben és az MPO-aktivitásban ismételt SOM-14-kezelés hatására.



I/16. ábra. Szomatosztatin szerepe az endotoxinnal kiváltott gyulladásos szövettani változásokban. LPS által kiváltott gyulladásos szövettani elváltozások (A) WT, (B) TRPV1^{-/-}, (C) C-SOM-mal kezelt WT és (D) SOM-14-kezelt TRPV1^{-/-} egerekben. A metszetek PAS festéssel készültek a nyáktermelő kehelysejtek jobb azonosítása érdekében, 200x-os nagyítás; [a]: alveolus, [b]: bronchiolus, [v]: ér.



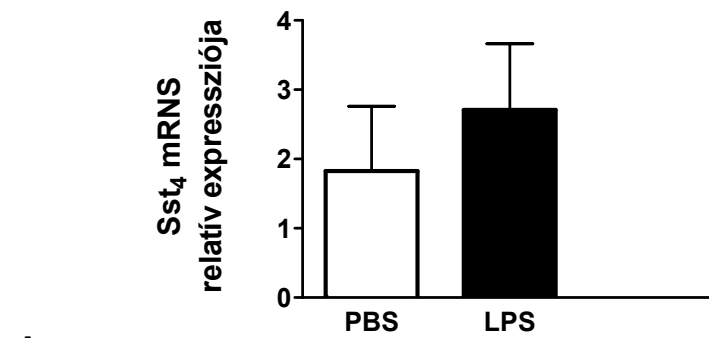
I/17. ábra. Szomatosztatin szerepe az LPS-sel kiváltott (A) gyulladásos szövettani pontszámra és (B) MPO-aktivitásra (átlag±SEM értékeket mutatnak; *p<0.05, **p<0.01 vs. WT; +p<0.01 vs. TRPV1^{-/-}).

I. 4. 3. Fejezet: AZ SST₄ RECEPTOR LOKALIZÁCIÓJA, EXPRESSZIÓJÁNAK VÁLTOZÁSA ÉS SZEREPE LÉGÚTI GYULLADÁSBAN

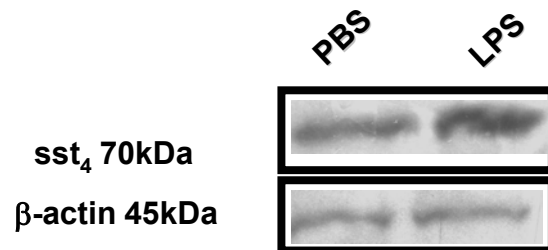
Az sst₄ receptor expressziója ép és gyulladt egértüdőben

Kvantitatív RT-PCR eredményeink azt mutatták, hogy az sst₄ receptor mRNS jelen van az egértüdőben, de koncentrációja nem változott az endotoxinnal kiváltott szubakut gyulladás hatására (*I/18. A. ábra*). Western blot vizsgálataink bizonyították az sst₄ receptor fehérjeszinten történő expresszióját is a tüdőben. A receptorprotein mennyisége azonban az mRNS-sel ellentétben jelentősen megnövekedett 24 órával az LPS intranazális adását követően. A kontroll fehérjeként szolgáló β -aktin mennyisége nem változott a gyulladás következtében (*I/18. B.,C. ábra*).

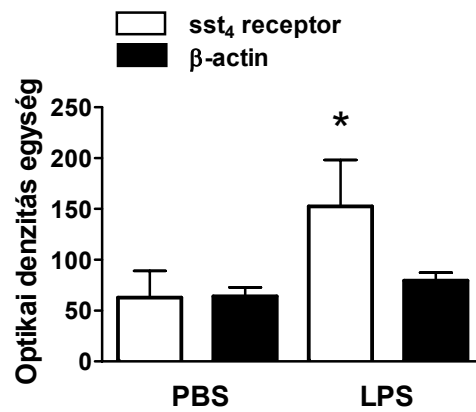
Ép tüdőben sst₄ receptor immunpozitivitás volt látható a bronchiális/bronchioláris epithelsejteken, elsősorban a lumen felőli felszínen, a vaszkuláris bronchiális/bronchioláris simaizomsejteken, az erek endothelsejtjein és az alveolusok közti szeptumokban lévő kötőszöveti sejteken (*I/19. A.,B. ábra*). Gyulladt tüdőszövetben azonban 24 órával az intranazális LPS-kezelés után a megvastagodott epithelrétegben fokozódott az sst₄ expresszió, valamint az erek és a bronchusok/bronchiolusok körül akkumulálódó mononukleáris sejtek (elsősorban makrofágok, de a limfociták is) és a neutrofil granulociták is jellegzetes sst₄ immunpozitivitást mutattak (*I/19. C.,D. ábra*). Ezek az immunhisztokémiai adatok alátámasztják a western blot módszerrel nyert eredményeinket.



A.

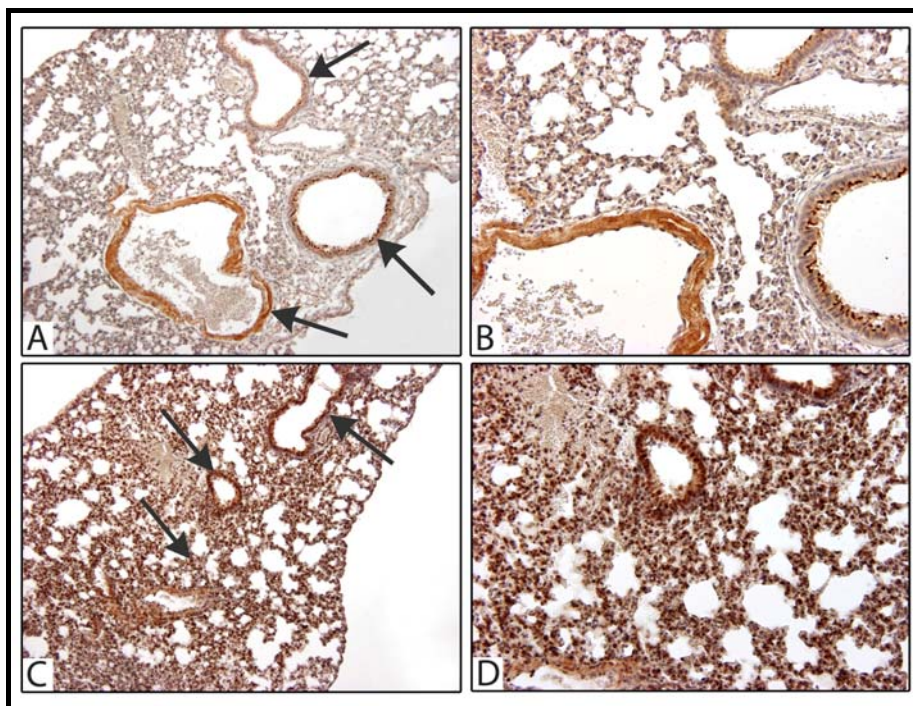


B.



C.

I/18. ábra. Sst₄ receptor expresszió intakt és gyulladt egértüdőben. (A) Az sst₄ receptor mRNA relatív expressziója 24 órával intranazális LPS-adás után, PBS-sel kezelt nem gyulladt tüdővel összehasonlítva. (B) Reprezentatív western blot minták az sst₄ receptor fehérje homogenizált ép és gyulladt tüdőből történő meghatározására. (C) A western blot minták denzitometriás vizsgálatának kvantitatív eredményei. Az oszlopok az A és C paneleken n=6 egér átlagát mutatják±SEM; *p<0.05 vs. PBS.



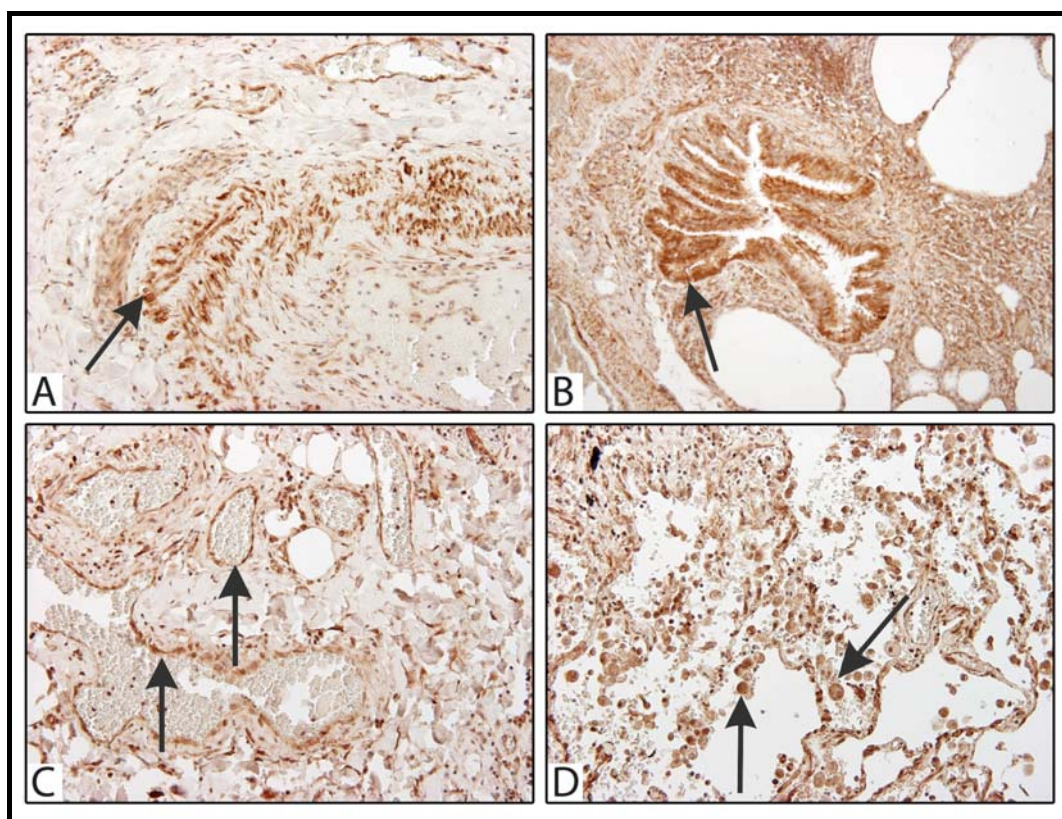
I/19. ábra. Szomatosztatin receptor immunlokalizációja egértüdőben. (A,B) intranazális PBS-sel kezelt egér tüdője 200x-os és 400x-os nagyítással, (C,D) intranazális LPS-sel kezelt egér tüdője 200x-os és 400x-os nagyítással (hematoxin magfestés).

Az sst₄ receptor expressziója ép és a gyulladt emberi tüdőben

A RT-PCR eredményeink alapján az sst₄ receptor mRNA jelen van az ép emberi tüdőben, relatív expressziója 1.14 ± 0.22 , amely nagyon hasonló az egértüdőben mérthez.

Négy beteg esetében (1., 4., 5. és 6.) jelentős, 3.4-30.07-szeres emelkedést találtunk a gyulladt minták sst₄ receptor mRNA expressziójában az azonos betegtől származó ép szövetrésszel összehasonlítva. E betegek jellegzetes klinikai tünetei és a gyulladt területek szövettani vizsgálata egyértelműen igazolták a krónikus bronchitis diagnózisát. Mind a négy beteg erős dohányos volt, a műtét két esetben kis perifériás primér adenokarcinóma miatt (4. és 6.), két esetben 2 cm-nél kisebb tüdőmetasztázis miatt (1.: hepatocelluláris karcinóma; 5.: vesekarcinóma) történt. A krónikus gyulladást igazolta a kifejezett mononukleáris sejtes infiltráció (deszkvamáló intersticiális pneumonitisz). Az sst₄ mRNA mennyisége a gyulladásos reakció súlyosságával egyértelmű korrelációt mutatott. Ezzel ellentétben, két betegnél (2. és 3.), ahol a szövettani diagnózis akut bronchopneumóniát igazolt, nem volt különbség az sst₄ mRNA expresszióban a gyulladt és az ép minták között. Ezeket a betegeket kiterjedt, hilusra lokalizálódó laphámkarcinóma miatt operálták, amely az obstrukció következtében a perifériás területeken atelektáziát és akut gennyos bronchopneumóniát okozott. A gyulladt területen a neutrofil sejtek akkumulációja dominált (**I/2. táblázat**).

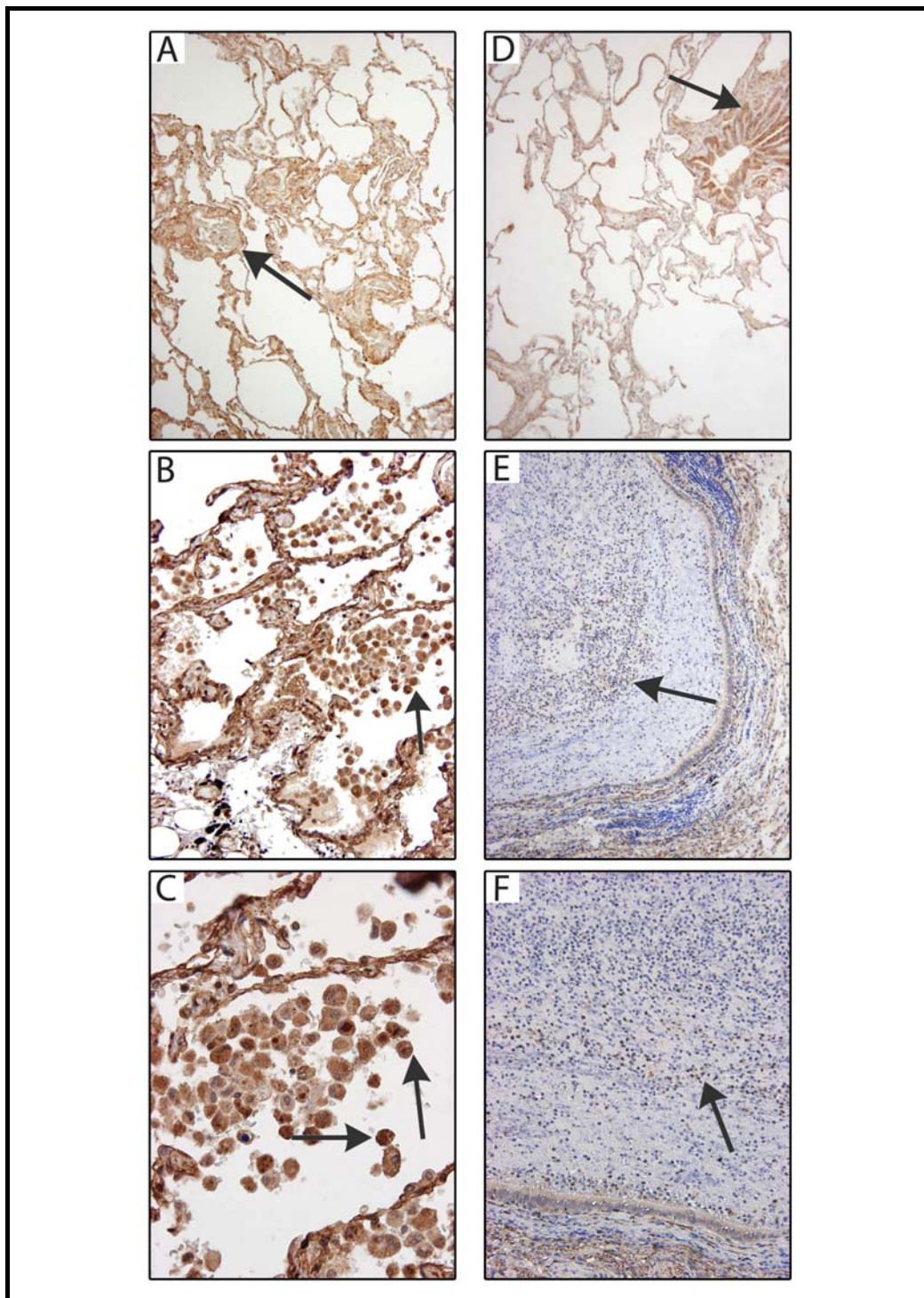
E tüdőminták immunhisztokémiai vizsgálatával nyert eredményeink azt mutatták, hogy az sst₄ receptor ép emberi tüdőben a bronchioláris epithelsejteken, vaszkuláris endothelsejteken (I/20. B.,C. ábra), simaizomsejteken (I/21. A. ábra) és a szeptumban lévő fibrocitákon (I/20. C. ábra) lokalizálódik nagyon hasonlóan az egérben tapasztaltakhoz (I/21. A.,D. ábra). Az I/22. ábra felső panele (B és C) az 1. számú beteg gyulladt tüdőmintájának sst₄ receptor immunlokalizációját mutatja. Az ép résszel összehasonlítva (I/20. A.,D. ábra), nagyszámú sst₄ pozitív aktivált makrofág és limfocita látható az alveolusokban a krónikus gyulladásos területen (I/21. B.,C. és I/22. D. ábra). Ez a morfológiai eredmény jól alátámasztja a markáns sst₄ mRNA expresszió-növekedést a gyulladt mintában. A 2. számú beteg esetében bronchiektáziával társuló akut purulens bronchopneumónia volt a diagnózis, a bronchiolus lumenét teljesen kitöltik a szövettörmelékbe és nyákba ágyazott sst₄ receptort nem expresszáló neutrofil granulociták, ezek mellett néhány sst₄ immunpozitív limfocita is látható (I/21. E.,F. ábra), ami jól magyarázza a minimális sst₄ mRNA növekedést.



I/20. ábra. Sst₄ receptor immunpozitivitás az emberi tüdőben. Az sst₄ receptor immunpozitivitás látható az (A) erek simaizomsejtjein, (B) a bronchusok/bronchiolusok epithelsejtjein, (C) az erek endothelsejtjein, a szeptumokban lévő fibrocitákon, valamint (D) krónikus gyulladás esetén az intraalveoláris területeken akkumulálódó aktivált makrofágokon és limfocitákon (deszkvamáló intraalveoláris pneumonitisz, respiratórikus bronchiolitisz) (400x-os nagyítás, hematoxilin magfestés).

Beteg	Gyulladás típusa: hisztopatológiai jellemzők	Az sst ₄ receptor mRNS expressziója a 18S riboszómális mRNS-re normalizálva		A relatív sst ₄ mRNS expresszió változása a gyulladt tüdőben az ép részhez viszonyítva
		Ép terület	Gyulladt terület	
1	Krónikus gyulladás nagyszámú aktivált makrofág alveoláris régiókba történő akkumulációjával (deszkvamáló intersticiális pneumonitisz), limfocitás infiltráció, peribronchioláris fibrózis, a makrofágokban és az intersticiális területeken is fekete granuláris pigmentdepozitumok, respiratorikus bronchiolitisz	1.21	36.39	30.07
2	Bronchiektázia talaján kialakuló akut gyulladásos reakció , granulocita-, elsősorban neutrofil-akkumuláció dominál a szövettörmelékekkel és nyákkal kitöltött bronchiolus/bronchus lumenben	1.52	1.86	1.22
3	Akut bronchopneumonia intersticiális ödémával és jelentős neutrofil sejtes infiltrációval	0.60	0.78	1.3
4	Krónikus bronchitisz , respiratorikus bronchiolitisz a tüdőparenchimát érintő gyulladásos jelek nélkül, centroacinális emfizéma	1.88	9.62	5.11
5	Krónikus gyulladás , limfocitás infiltráció dominál, respiratorikus bronchiolitisz aktivált makrofágokkal, dohányzás okozta pigmentgranulomok lerakódása	1.21	4.09	3.38
6	Krónikus gyulladás pigmentált intraalveoláris makrofág-csoportokkal, a respiratorikus bronchiolusok destrukciója, limfocitás infiltráció, atelektázia	0.42	8.24	19.62

I/2. táblázat. Az sst₄ receptor mRNS relatív expressziója emberi tüdőmintákban

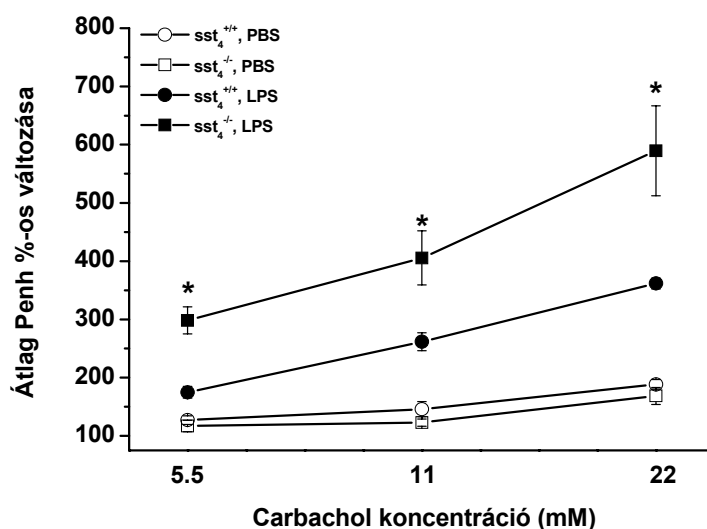


I/21. ábra. Az ss_{t4} receptor immunhisztokémiai vizsgálata (A,D) ép és (B,C,E,F) gyulladt emberi tüdőmintákban. A baloldali panelek az 1. számú betegből (krónikus bronchitisz), a jobboldaliak a 2. számú betegből (akut obstruktív purulens bronchopneumónia, bronchiektázia) származnak (A,B,D,E: 200x; C,F: 400x-os nagyítás, hematoxin magfestés).

AZ SST₄ RECEPTOR SZEREPE ENDOTOXINNAL KIVÁLTOTT LÉGÚTI GYULLADÁSBAN EGÉRBEN

Endotoxinnal kiváltott légúti hiperreaktivitás sst₄^{+/+} és sst₄^{-/-} egerekben

A carbachol-inhaláció mindkét csoportban koncentrációfüggő bronchokonstriktációt okozott, a PBS-kezelt sst₄^{+/+} és sst₄^{-/-} állatok válasza között nem volt jelentős különbség. LPS-sel kiváltott gyulladásban azonban az sst₄^{-/-} egerek maximális Penh értékei nagyobbak voltak és a bronchokonstriktáció időtartama hosszabb volt a receptor génhiányos csoportban (I/22. ábra).

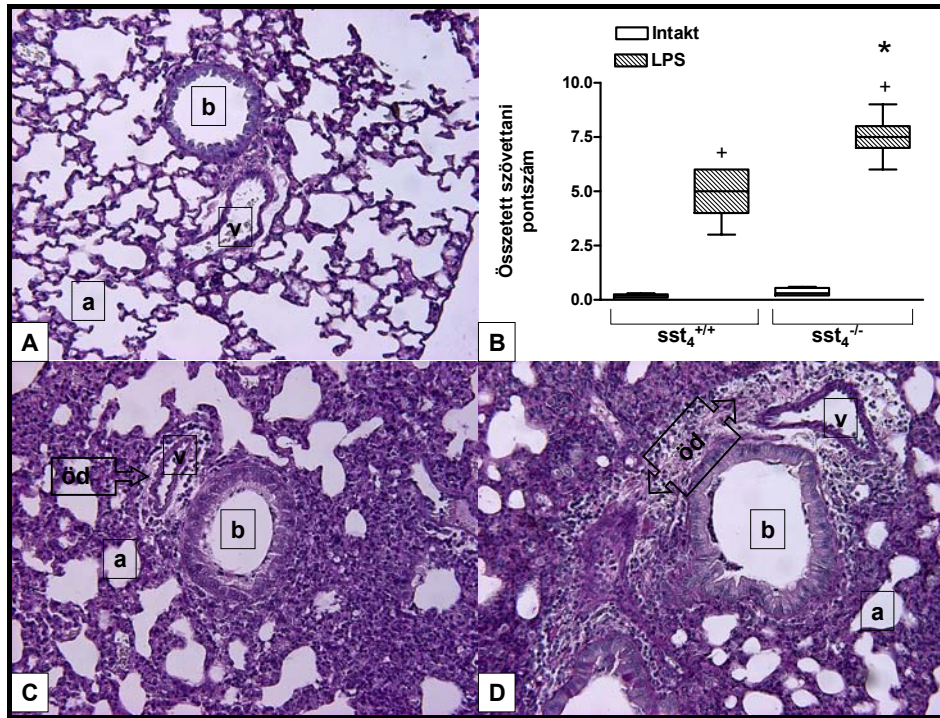


I/22. ábra. Endotoxinnal kiváltott légúti hiperreaktivitás sst₄^{+/+} és sst₄^{-/-} egerekben (átlag±SEM; *p<0.05 vs. sst₄^{+/+}).

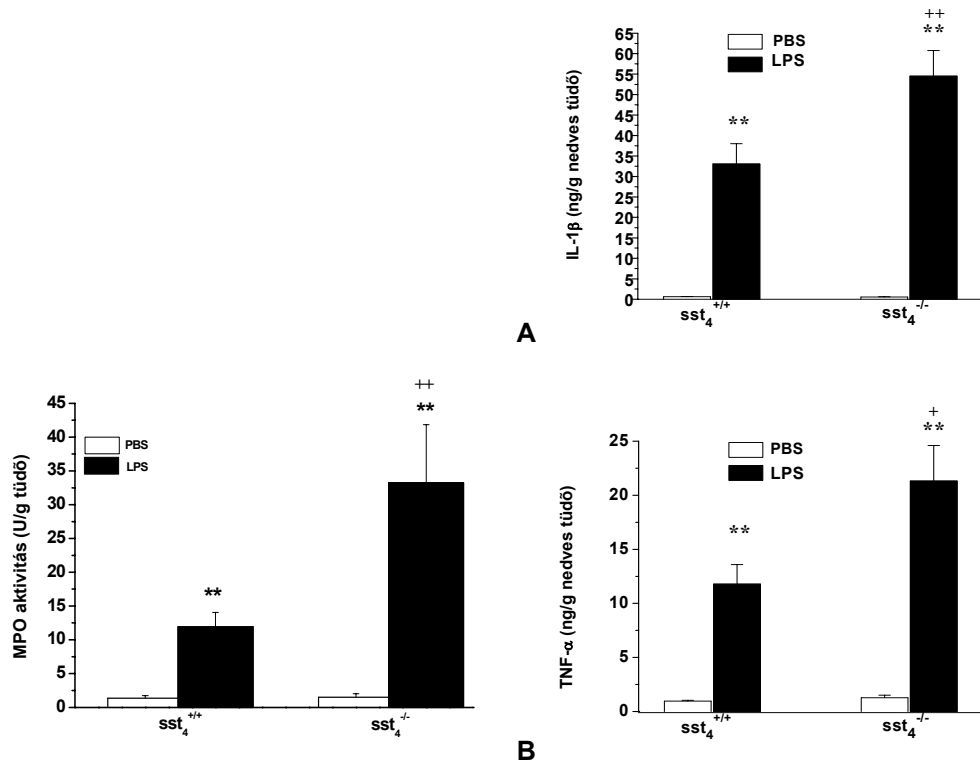
Gyulladásos változások, MPO-aktivitás és citokin-koncentrációk sst₄^{+/+} és sst₄^{-/-} egerek tüdejében

A szövettani vizsgálatok és a szemikvantitatív értékelés azt mutatták, hogy az LPS hatására az sst₄^{-/-} egerek tüdejében jelentősen súlyosabb gyulladás alakult ki, mint a vad típusúakban: kifejezettebb peribronchiális/perivaszkuláris ödéma, a bronchusok, bronchiolusok körül fokozottabb granulocita-felhalmozódás, intenzívebb mononukleáris sejtes infiltráció és goblet sejt hiperplázia volt megfigyelhető (I/23. ábra).

Az LPS-kezelés mindkét csoportban többszörösére emelte a gyulladt szövetben felhalmozódott granulociták mennyiségét jelző MPO-aktivitást, valamint az IL-1β és TNF-α mennyiségét a megfelelő PBS-kezelt kontrolljaikhoz hasonlítva. Ez az emelkedés mindhárom paraméter esetében szignifikánsan nagyobb volt az sst₄^{-/-} csoportban, mint a vad típusú egerekben (I/24., I/25. ábra).



I/23. ábra. LPS-sel kiváltott gyulladásos változások $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerek tüdejében. (A) intranazális PBS-sel és (C) LPS-sel kezelt $sst_4^{+/+}$, valamint (D) LPS-kezelt $sst_4^{-/-}$ egér tüdejének metszete (PAS festés, 200x-os nagyítás; [a]: alveolus, [b]: bronchiolus, [v]: ér, [öd]: ödéma). (B) Szemikvantitatív szövettani értékelés pontszámai (statisztikai középértékek \pm 25-75 percentilis; * p <0.01 vs. PBS; * p <0.05 vs. $sst_4^{+/+}$).



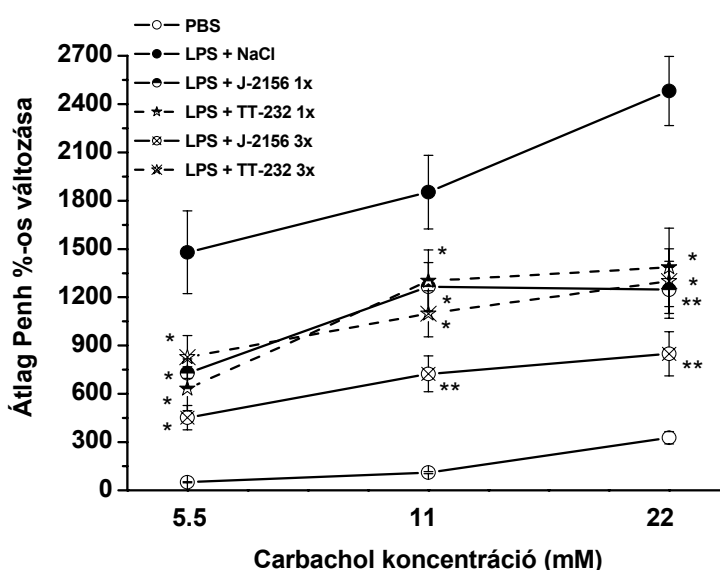
I/24. ábra. Mieloperoxidáz aktivitás.

I/25. ábra. Citokin koncentrációk. (átlag \pm SEM; ** p <0.01 vs. PBS, + p <0.05, ++ p <0.01 vs. $sst_4^{+/+}$ egerek).

I. 4. 4. Fejezet: SST₄ RECEPTOR AGONISTA VEGYÜLETEK HATÁSA AKUT ÉS KRÓNIKUS LÉGÚTI GYULLADÁS MODELLJEIBEN

J-2156 és TT-232 hatása az endotoxinnal kiváltott gyulladásos légúti hiperreaktivitásra

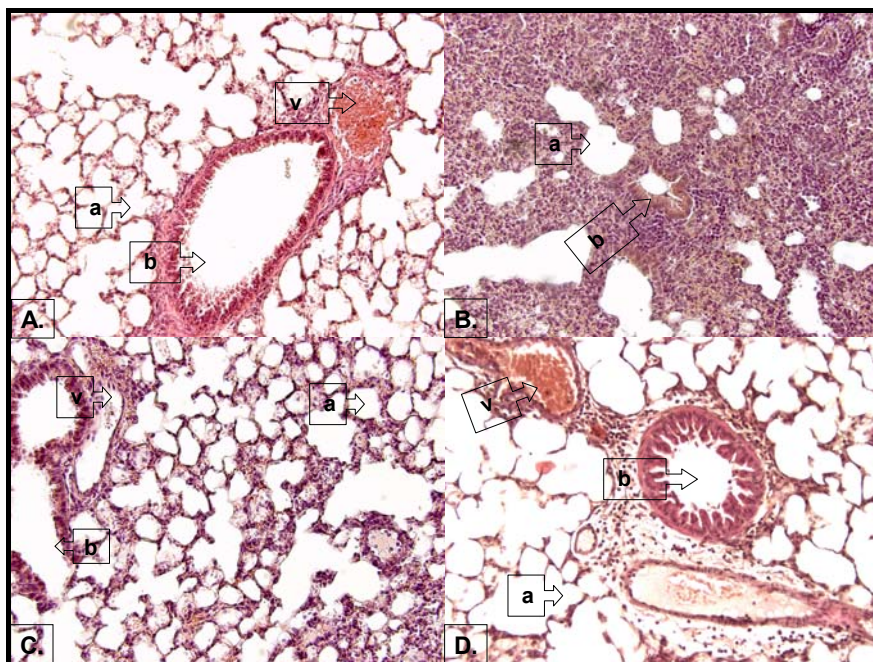
A carbachollal kiváltott koncentrációfüggő bronhokonstriktációt az 500 µg/kg i.p. J-2156 és TT-232 szignifikánsan gátolta. A hiperreaktivitást csökkentő hatás nemcsak a 24 óra alatti háromszori injekciót követően volt megfigyelhető, hanem a gyulladás kialakulása után adott egyszeri dózis esetén is. Az sst₄ agonisták fokozott légúti válaszkésztséget csökkentő hatása tehát elsősorban nem a gyulladásos reakció gátlásának köszönhető (I/26. ábra).



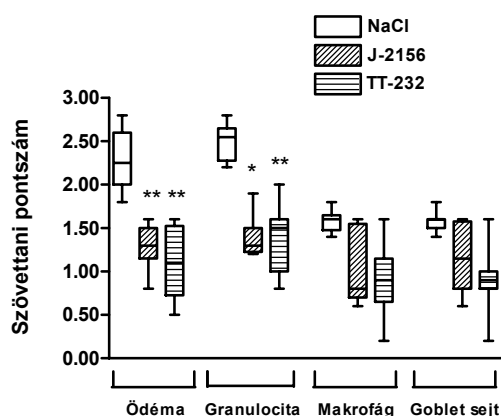
I/26. ábra. J-2156 és TT-232 gátló hatása endotoxinnal kiváltott gyulladásos légúti hiperreaktivitásra (átlag±SEM; *p<0.05 és **p<0.01 vs. kontroll LPS-kezelt csoport).

J-2156 és TT-232 hatása az endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladásra

A CD1 egerekben is a C57Bl/6 törzshöz hasonlóan az intranazális LPS-alkalmazás peribronchiális/perivaszkuláris ödémát, bronchusok körüli granulocita-felhalmozódást, alveoláris terekbe történő mononukleáris sejt (főleg makrofágok) infiltrációt és kehelysejt-felszaporodást okozott (I/28. B. ábra). A gyulladás kialakulása alatt háromszor i.p. injektált J-2156 és TT-232 kezelés az ödémát és a granulocita-akkumulációt szignifikánsan gátolta (I/27. C.,D. ábra; I/28. ábra). A homogenizált tüdőkből mért MPO-aktivitás LPS hatására kb. ötszörösére növekedett az intakt mintákkal összehasonlítva. Ezt a fokozódást a J-2156-tal és a TT-232-vel történő ismételt kezelés ugyancsak szignifikánsan gátolta (I/3. táblázat).



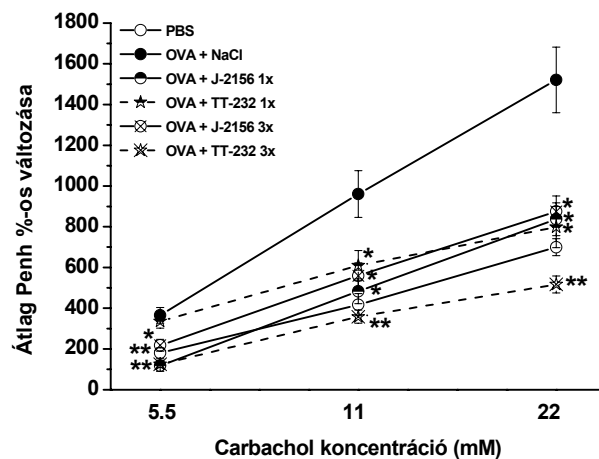
I/27. ábra. J-2156 és TT-232 gyulladáscsökkentő hatása az LPS-sel kiváltott gyulladásra. (A) Intakt tüdő szerkezete, (B) LPS-indukálta gyulladás fiziológiás sóval kezelt kontroll egér, (C) J-2156-tal és (D) TT-232-vel kezelt egér tüdeje (HE festés, 200x-os nagyítás; [a]: alveolus, [b]: bronchiolus, [v]: ér).



I/28. ábra. Szemikvantitatív szövettani értékelés az endotoxinnal kiváltott akut légúti gyulladásban (statistikai középérték \pm 25-75 percentil; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. oldószer).

J-2156 és TT-232 hatása az ovalbuminnal kiváltott gyulladásos légúti hiperreaktivitásra

A szenzitizált állatokban OVA belélegeztetésével kiváltott légúti gyulladásban jelentősen fokozódott a bronchiális válaszkészség. A hiperreaktivitást a J-2156 és a TT-232 is kb. 50%-kal gátolta, mind az expozíciós periódus 3 napja alatt ismételt alkalmazott injekciók, mind az egyszeri adás után. Figyelemreméltó, hogy a TT-232 ismételt alkalmazása után a légúti hiperreaktivitás teljesen megszűnt és a carbachol-indukálta bronchokonstrikció még kisebb volt, mint az intakt egerekben (I/29. ábra).



I/29. ábra. J-2156 és TT-232 gátló hatása az ovalbuminnal kiváltott krónikus gyulladásos légúti hiperreaktivitásra (átlag \pm SEM; * p <0.05 és ** p <0.01 vs. OVA-kezelt kontroll).

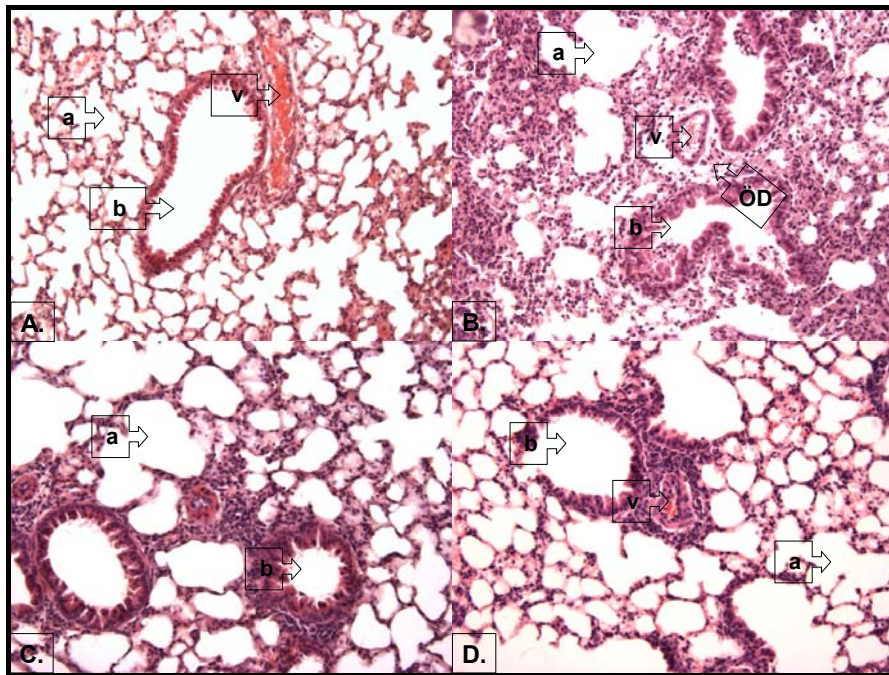
J-2156 és TT-232 hatása az ovalbuminnal kiváltott krónikus légúti gyulladásra

Szenzitizált Balb/c egerek tüdejében az ép tüdővel (I/31. A. ábra) összehasonlítva OVA hatására a bronchusok/bronchiolusok lumenében és körülöttük is jelentősen felszaporodtak a granulociták (elsősorban eozinofil sejtek), a bronchus nyálkahártya megduzzadt és megnövekedett a nyáktermelés, valamint több helyütt az epithelsejtek pusztulása volt látható (I/30. B. és I/31. ábrák). Míg ismételt TT-232-kezelés mindhárom gyulladásos paramétert szignifikánsan gátolta, a J-2156 a nyálkahártya-ödémát és a nyáktermelést csökkentette ugyan, de ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (I/30. C.,D. és I/31. ábrák).

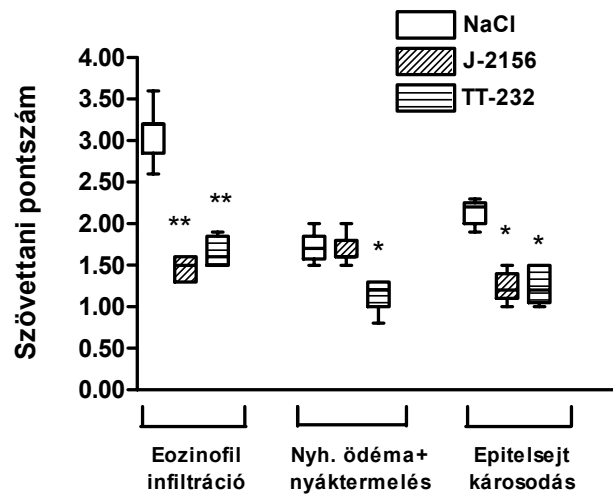
A felhalmozódott granulociták mennyiségét jelző MPO-aktivitás a homogenizált tüdőben a krónikus modellben csaknem tízszeresére emelkedett, amelyet mindkét sst_4 agonistával történő ismételt kezelés szignifikánsan csökkentett (3. táblázat).

	LPS (CD1 egér)	Ovalbumin (Balb/c egér)
	MPO U/g nedves tüdő	
Intakt	72.6 \pm 4.3	84.2 \pm 6.7
NaCl	373.4 \pm 54.1	797.7 \pm 71.6
TT-232	216.2 \pm 38.4 *	505.8 \pm 34.1 **
J-2156	132.7 \pm 14.4 **	463.6 \pm 58.0 **

I/3. táblázat. A tüdőminták mieloperoxidáz aktivitása. Az eredmények átlagértékeket \pm SEM mutatnak; * p <0.05, **<0.01 vs. oldószerrel (NaCl) kezelt LPS/OVA kontroll csoportok.



I/30. ábra. J-2156- és TT-232-kezelés gyulladáscsökkentő hatása az OVA-val kiváltott krónikus légúti gyulladásban. (A) Intakt tüdő szerkezete, (B) OVA-indukálta gyulladás fiziológiás sóval (oldószer) kezelt kontroll, valamint ismételt (C) J-2156- és (D) TT-232-kezelt egerek tüdeje. (HE festés, 200x-os nagyítás; [a]: alveolus, [b]: bronchus, [v]: ér, [öd]: ödéma).



I/31. ábra. OVA-val kiváltott krónikus légúti gyulladás szemikvantitatív szövettani értékelése. Az oszlopok statisztikai középértékeket \pm 25-75 percentileket mutatnak; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. oldószerrel (NaCl) kezelt csoport.

I. 5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Az irodalmi adatok a kapszaicin-érzékeny peptiderg afferensek légúti gyulladásban és bronchiális válaszkészségben betöltött szerepére vonatkozóan meglehetősen ellentmondásosak (Bloom és Polak 1985; Barnes 1990; Lundberg 1995; Maggi 1995; Uddman et al. 1997). Számos szerző ezekből az idegvégződésekből felszabaduló pro-inflammatorikus szenzoros neuropeptidek, a SP, az NKA és a CGRP neurogén gyulladást és fokozott bronchokonstriktációt kiváltó hatásait tartják dominánsnak a tüdőben (Frossard és Advenier 1991; Lagente és Advenier 1998; Springer et al. 2003), mások ezzel ellentétben a kapszaicin-érzékeny rostok védő szerepéről számoltak be légúti gyulladásos folyamatokban (Long et al. 1996). Ennek az ellentmondásnak magyarázatául szolgálhatnak a kísérletekben használt eltérő fajok, törzsek, valamint a különböző modellek, az ezekben szerepet játszó eltérő patofiziológiai folyamatok. Eredményeink alapján a tüdő kapszaicin-érzékeny idegvégződéseinek, valamint az ezeken lokalizálódó TRPV1 ioncsatornának egyértelműen gyulladáscsökkentő szerep tulajdonítható az endotoxinnal kiváltott szubakut intersticiális pneumonitisz-modellben egérben. Bár a tachikinineknek és a CGRP-nek szerepe van a bronchiális hiperreaktivásban és a gyulladásos reakciók bizonyos paramétereiben, a kapszaicin-érzékeny rostok protektív hatása a belőlük -elsősorban TRPV1 receptor aktivációval- felszabaduló szomatosztatinnak köszönhető. A szisztémás keringésbe jutó szomatosztatin az sst₄ receptorok aktivációjával csökkenti a gyulladás intenzitását és a légúti válaszkészség-fokozódást is.

Az endoxin intranazális alkalmazása jól definiálható, akut intersticiális gyulladást okoz a tüdőben, amely következményes bronchopulmonáris hiperreaktivitással jár (Lefort et al. 2001). Az LPS a monociták/makrofágok elsődleges aktivátora, a belőlük felszabaduló gyulladásokeltő citokineken (elsősorban TNF- α , IL-1 β és IL-6) keresztül a granulociták infiltrációját, aktivációját és további citokin termelését okozza (Savov et al. 2002; Rocksén et al. 2003). A neutrofilek aktivitása központi szerepet játszik az LPS-sel kiváltott gyulladásban és fokozott légúti válaszkészségben, mivel hiányuk esetén az endotoxin gyulladásokeltő hatása nem valósul meg (Savov et al. 2002). A peribronchiális, perivaszkuláris területeken felszaporodott neutrofil sejtekből felszabaduló reaktív oxigéngyökök, proteázok, citokinek és kemokinek szöveti károsodást okoznak, valamint tovább fokozzák a mononukleáris sejtek beáramlását és aktivációját (Kraneveld és Nijkamp 2001). A gyulladásos és immunsejtekből számos mediátor - leukotriének, prosztaglandinok, bradikinin, protonok, stb. - szabadul fel,

amely sokféle receptort, pl a szenzoros idegvégződéseken található TRPV1 csatornát is képesek aktiválni és/vagy szenzitivizálni (Barnes 1990; Lundberg 1995). Ennek következményeképpen az afferens idegvégződésekből felszabaduló gyulladásokeltő szenzoros neuropeptidok vazodilatációt és plazmafehérje-kiáramlást okoznak, valamint tovább fokozzák a gyulladásos sejtek aktivációját, amellyel súlyosbítják a reakciót (Barnes 1990).

Jelen kísérleteink szolgáltatták az első bizonyítékot arra, hogy endotoxinnal kiváltott légúti gyulladásban a neurogén gyulladásért felelős mediátorok, a SP és a CGRP, tüdőbeli koncentrációja megnövekedik. Mivel a kapszaicin-szenzitív érzőideg-végződések RTX-előkezeléssel történő inaktivációja után ez az emelkedés elmaradt, a gyulladás hatására történő koncentráció-fokozódás e szenzoros rostokban lévő, illetve onnan felszabaduló peptideknek köszönhető. Ezzel szemben az afferensek károsítása után e peptidek alapmennyisége nem változott, ami arra utal, hogy jelentős mennyiségben megtalálhatók egyéb sejtekben is, pl. a légutak epithelsejtjeiben (Rennick et al. 1992; Hastings és Hua 1995; Li et al. 2004), a neuroendokrin és immunsejtekben (Springer et al. 2003; Nelson és Bost 2004). Nem gyulladt tüdőben a nem-neurális forrásokból származó SP és CGRP mennyiségéhez viszonyítva, amelyek nem depletálódnak az RTX-előkezelés hatására (Szállási és Blumberg 1989; Szolcsányi et al. 1990; Szállási és Blumberg 1999), a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekben található peptidmennyiség alacsony. Gyulladásos körülmények között azonban ezeket az idegvégződéseket sokféle mediátor stimulálja, mely fokozza a neuropeptid-szintézist a hátsó gyöki ganglionokban, növeli a periféria felé történő axonális transzportjukat és feltehetően fokozza felszabadulásukat is (Baluk et al. 1999; Belvisi 2003; Dinh et al. 2004). Mivel ép tüdőben a nem-neuronális SP, CGRP mennyiségéhez képest a neuronális tartalom elenyésző, a gyulladás hatására tapasztalt 30%-os koncentráció-növekedés jelentős mértékűnek tekinthető.

A kapszaicin-szenzitív afferensek degenerációja szignifikánsan súlyosbította a légúti gyulladás szövettani paramétereit, a granulocita-akkumulációt jelző MPO-aktivitást és az IL-1 β -termelést is. Több korábbi irodalmi adat arra utal, hogy patkányban a kapszaicin-szenzitív rostoknak védő szerepe van különböző légúti gyulladásos modellekben (Hashiba et al. 1989; Long et al. 1996; Bowden et al. 1996; Franco-Penteado et al. 2005). Az újszülöttkori kapszaicin-kezelés, amely irreverzibilisen károsítja az afferens C-rostokat, megnövekedett neutrofilszámot és TNF- α -mennyiséget eredményezett a bronchoalveoláris mosófolyadékban LPS intratracheális alkalmazását követően (Long et al. 1996). Ilyen előkezelés után továbbá jelentősen fokozódott az ovalbumin-indukálta allergiás légúti gyulladás (Franco-Penteado et al. 2005), illetve a *Mycoplasma pulmonis* okozta idült tüdőgyulladás (Bowden et al. 1996).

A mi eredményeinkkel összhangban tehát ezek az adatok is a kapszaicin-szenzitív rostok gyulladásgátló szerepére utaltak a légutakban, de a gátló mediátorra vonatkozóan nem szolgáltatott kísérletes bizonyítékokat. Jelen és korábbi eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy e gátló hatásért elsősorban a tüdő kapszaicin-szenzitív érzőidegvégződéseiből felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin a felelős, bár egyéb inhibitoros neuropeptidek, pl. opioid peptidek, hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) vagy a galanin szerepe sem zárható ki.

A tachikininek és a CGRP szerepét az LPS-sel kiváltott légúti gyulladásban specifikus receptor antagonistáik segítségével vizsgáltuk. Funkcionális jelentőségüket a peribronchiális granulocita-akkumulációban, MPO-aktivitásban és IL-1 β -termelésben sikerült igazolnunk. E gyulladásos paraméterek endotoxin hatására létrejövő növekedését az NK₁ és az NK₂ receptor antagonisták kombinációjával, illetve a CGRP1 receptor antagonistával történő kezelés csökkentette szignifikánsan. A CGRP immunmodulátor hatásokkal rendelkezik, serkenti a granulocita-felhalmozódást és a T-sejt adhéziót patkányban és tengerimalacban. Fokozza a gyulladásos citokinek (IL-6, IL-8 és TNF- α) felszabadulását humán bronchus epithelsejtekből. Az endothelsejtek és granulociták külső felszínén lévő NK₁, NK₂ receptorok és CGRP1 receptorok aktivációja részt vesz az adhéziós molekulák expressziójában és a következményes leukocita adhézióban és akkumulációban (DeRose et al. 1994). Az MPO-aktivitás és az IL-1 β szorosan összefüggő gyulladásos paraméterek, több adat azt bizonyítja, hogy az IL-1 β erősen befolyásolja a neutrofil felszaporodást. Ezenkívül, a granulociták mellett sok egyéb gyulladásos sejt képes szintetizálni IL-1 β -t (Ahluwalia et al. 1998; Pintér et al. 2002). Egyik vizsgált antagonista, sőt kombinációjuk sem befolyásolta jelentősen az összetett gyulladásos pontszámot, feltehetően azért, mert ennek az értéknek a kiszámításához négy különböző jellemzőt veszünk alapul, melyek között a leukocita felhalmozódás csak az egyik paraméter. A többi három paramétert, a perivaszkuláris ödémát, a makrofág infiltrációt és a nyáktermelő kehelysejtek hiperpláziáját nem változtatta meg egyik kezelés sem. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a gyulladásos szenzoros neuropeptidek csak kisebb szerepet játszanak az endotoxin-indukálta légúti gyulladásban.

Az RTX-szel előkezelt egerekben a súlyosabb gyulladás ellenére a bronchiális hiperreaktivitás jelentősen csökkent. Ennek a látszólagos ellentmondásnak a feloldásául az szolgálhat, hogy a gyulladásos folyamat kialakulásában döntő jelentőségű a kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló gátló hatású szenzoros neuropeptidek, elsősorban a szomatosztatin, védő hatása, míg a bronchiális válaszkésztség fokozódásában priméren a pro-

inflammatorikus szenzoros mediátorok játszanak közvetlenül szerepet (Lundberg 1995). A bronchusok simaizomsejtjein kifejtett direkt hatás mellett a SP közvetett neurális mechanizmussal is fokozhatja a bronchokonstriktációt: a kolinerg idegvégződésen lokalizálódó NK₁ receptor aktivációján keresztül acetilkolin-felszabadulást okoz (Colasurdo et al. 1995; Ladenius et al. 1995). Az endotoxin-kiváltotta légúti gyulladásban az NK₂ receptor antagonista SR48968 gátolta szignifikánsan a carbachollal kiváltott választ, amely bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy e modellben az NK₂ receptoroknak van döntő jelentősége a bronchiális hiperreaktivásban. A CGRP1 receptor antagonista CGRP(8-37), valamint az NK₁ receptor antagonista SR140333 nem okozott szignifikáns gátlást, sőt ez utóbbi kombinációban sem fokozta az NK₂ receptor antagonista hatását, amely arra utal, hogy a CGRP1 és az NK₁ receptorok minimális szerepet játszanak e válaszban.

A kapszaicin-érzékeny idegvégződéseken lokalizálódó TRPV1 receptor légúti gyulladásban betöltött szerepét receptor génhiányos egerek (Davis et al. 2000) segítségével vizsgáltuk. Intranazális LPS-kezelést követően TRPV1^{-/-} egerekben súlyosabb légúti gyulladásos reakciót és fokozódó bronchiális hiperreaktivitást figyelhattunk meg. E védő hatás hátterében a tüdő kapszaicin-érzékeny afferensein található TRPV1 ioncsatorna gyulladásos mediátorokkal (lipoxigenáz termékek, protonok, prosztaglandinok, bradikinin, stb.) történő aktivációja/szenzitizációja áll, melynek következményeképpen ezekből az idegvégződésekből szomatosztatin szabadul fel és a szisztémás keringésbe jut. Ezt a magyarázatot alátámasztják azon eredményeink, hogy intranazális endotoxin-kezelés szignifikánsan megnövelte a szomatosztatin koncentrációját vad típusú egerek tüdejében és a plazmájában, azonban a TRPV1 receptor génhiányos csoportban ez az emelkedés elmaradt. A TRPV1 receptor aktivációja tehát nemcsak a gyulladásos neuropeptidek (SP, NKA, CGRP) felszabadulását, hanem a tüdő kapszaicin-szenzitív rostjaiban szintén jelenlévő szomatosztatin (Hökfelt et al. 1976) kiáramlását is eredményezi. Immunohisztokémiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a szomatosztatin és a SP/CGRP különböző idegvégződésekben található és csak kis mértékben kolokalizálódnak (Hökfelt et al. 1976; Maggi 1995).

A felszabaduló szomatosztatin funkcionális jelentőségére a szomatosztatin receptor antagonista ciklo-szomatosztatinnal nyert adataink szolgáltattak bizonyítékot. A C-SOM, amely mind az öt receptoron (sst₁-sst₅) (Hoyer et al. 1995; Pintér et al. 2006) gátolja a szomatosztatin hatásait, jelentősen megnövelte a gyulladást és a bronchiális hiperreaktivitást vad típusú egerekben, megszüntette a szignifikáns különbséget a TRPV1 génhiányos egerekhez viszonyítva.

A SOM-14-kezelés mindkét csoportban szignifikánsan csökkentette a gyulladásos reakciót és a megnövekedett bronchokonstriktó-hajlamot valószínűleg a gyulladáskeltő neuropeptidek felszabadulásának (Pintér et al. 2006), a monocita-makrofág funkciók (Krantic 2000) és a limfocita proliferáció/citokin termelés (Kolasinski et al. 1992; Pintér et al. 2006, 2009) gátlásán keresztül.

Bár számos korábbi eredményünk alapján (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002; Szolcsányi et al. 2004; Pintér et al. 2006) feltételeztük, hogy a bronchusokat/bronchiolusokat beidegző kapszaicin-szenzitív idegvégződésekből felszabaduló szomatosztatin légúti gyulladást és hiperreaktivitást gátló hatásait az sst₄ receptoron keresztül fejti ki, nem állt rendelkezésre adat az irodalomban az sst₄ tüdőbeli lokalizációjára. Elsőként mutattuk ki az sst₄ receptorok expresszióját egér tüdőben immunhisztokémiai, western blot és molekuláris biológiai módszerekkel. Az ép, nem gyulladt tüdőben az sst₄ receptor a bronchiális epithelsejteken, az erek és bronchusok/bronchiolusok falában lévő simaizomsejteken, a vaszkuláris endothelsejteken és az interalveoláris szeptumokban található fibrocitákon lokalizálódnak. Továbbá gyulladásos stimulusok hatására a nagy számban beáramló mononukleáris sejtek (makrofágok és limfociták) és neutrofil granulociták jelentős sst₄ immunpozitivitást mutattak. Ezeket az adatok támasztják alá az sst₄ receptorfehérje expressziójára vonatkozó kvantitatív adatok, amelyek jelentős növekedést mutattak a gyulladt tüdőszövetben. Az sst₄ mRNS jelenlétét a tüdőben RT-PCR módszerrel ugyancsak sikerült igazolnunk, azonban az ép és a gyulladt szövetekben mért mRNS koncentrációk között nem volt különbség. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az LPS hatására a mononukleáris sejtek már a kész receptorral a felszínükön áramlanak a tüdőbe és a receptor fehérje nem helyben szintetizálódik, de a gyulladás hatására történő fokozott RNS-lebomlás is lehetséges. Ép emberi tüdőmintákon az sst₄ receptor mRNS relatív expressziója és lokalizációja nagyfokú hasonlóságot mutatott az egérben tapasztaltakkal. Gyulladt tüdőben az sst₄ expressziója a gyulladás típusától, mechanizmusától és a domináns sejtípustól függ. Krónikus bronchitiszben, ahol a respiratorikus bronchiolusok kifejezett destrukciója, aktivált makrofágok és limfociták intraalveoláris akkumulációja volt jellemző, az sst₄ receptor-expresszió nagy mértékben fokozódott. Ezzel szemben akut purulens bronchopneumóniában, ahol a szövettani képet a bronchiolusok/bronchusok neutrofil sejtekkel, nyákkal, szövettörmelékekkel való teljes kitöltöttsége jellemezte, nem volt jelentős változás az sst₄ receptor mRNS mennyiségében. Az emberi makrofágok és limfociták az egérhez hasonlóan sst₄ immunpozitívak, az egyetlen különbség, hogy míg egérben a neutrofil sejteken is megtalálható az sst₄, emberben ezek a granulociták nem hordozzák e receptort. Ez az eredmény egyébként emberi perifériás

véresejteken közölt irodalmi adatokkal összhangban áll (Hiruma et al. 1990). Az sst₄ receptor expressziójának emberi és egértüdőben tapasztalt hasonlósága arra utal, hogy e receptor szerepére vonatkozó, egérmodellekben nyert eredményeink jól extrapolálhatók emberi légúti gyulladásos folyamatokra.

Az sst₄ receptor funkcionális jelentőségére vonatkozóan egyértelmű bizonyítékokat a génhiányos egereken végzett kísérleteink szolgáltatnak. Az sst₄ receptor hiányában az endotoxinnal kiváltott tüdőgyulladásban a mieloperoxidáz aktivitás, a gyulladásos citokinek mennyisége és a következményes bronchiális hiperreaktivitás nagymértékben fokozódtak, valamint a szövettani paraméterek is súlyosbodtak. Az sst₄ KO egerekben a nyáktermelő helysejtek megnövekedett száma összhangban áll a szomatosztatin azon a hatásával, hogy képes csökkenteni a nyákszekréciót patkányban (Wagner et al. 1995). Az akkumulálódott mononukleáris sejtek száma nem volt szignifikánsan nagyobb az sst₄^{-/-} csoportban, azonban aktivitásuk valószínűleg fokozódott, amire a megnövekedett IL-1 β és TNF- α -termelés is utal. A receptor génhiányos egerekben megfigyelhető kifejezettebb neutrofil-inváziót és a légutak fokozott reakciókészségét jól magyarázza granulocitákon és a bronchiális simaizomsejteken tapasztalt sst₄ immunopozitivitás, de közvetett módon szerepet játszhat a gyulladásos neuropeptidek és a makrofágokból származó mediátorok fokozott felszabadulása is.

Utolsó kísérletsorozatunkban morfológiai, kémiai és légzésfunkciós bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy az sst₄/sst₁ receptor agonista, heptapeptid TT-232 (Helyes et al. 2005) és az sst₄ szelektív peptidomimetikum J-2156, hatékonyan gátolja a légúti gyulladást és a következményes hiperreaktivitást az endotoxinnal kiváltott akut és az ovalbuminnal indukált krónikus egérmodellekben. A két vizsgált agonista mindkét modellben hasonló mértékű gyulladásgátló hatást okozott. Ebben szerepet játszhat a gyulladáskeltő neuropeptidek (SP és CGRP) felszabadulásának gátlása a perifériás kapszaicin-szenzitív érzőideg-végződésekből, amelyet izolált patkány trachea perfúziós modellben korábban igazoltunk (Helyes et al. 2001, 2005, 2006). Az sst₄ agonisták továbbá a neurogén gyulladás csökkentésén túl a nem-neurogén komponenst is képesek közvetlenül gátolni a gyulladásos sejteken, illetve a hízósejteken hatva (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002, 2006; Helyes et al. 2006). Az egér granulociták –az emberben tapasztaltakkal ellentétben– sst₄ receptort expresszálnak, a TT-232 és a J-2156 granulocita-akkumulációt gátló hatása részben közvetlen gátló hatás lehet, részben más sejtekből (makrofágok, limfociták) történő kemotaktikus és gyulladáskeltő mediátorok, citokinek, valamint a szenzoros neuropeptidek felszabadulásának csökkentésén keresztül valósulhat meg. Az utóbbi elméletet támasztja alá az is, hogy a J-2156 csökkenti izolált

peritoneális makrofágokban az LPS hatására történő IL-1 β -termelést és *in vivo* az endotoxin modellben a tüdőben mért IL-1 β koncentrációt (Helyes et al. 2006).

A krónikus légúti gyulladásban a TT-232 nagyobb mértékben csökkentette a fokozott légúti válaszkésztséget, melynek magyarázatául szolgálhat, hogy a TT-232 az sst₄ mellett az sst₁ receptort (Helyes et al. 2005), valamint mindkét foszfortirozin-foszfatazt és néhány fehérje-kinázt, mint például az extracelluláris szignálok által regulált kinázokat (ERK2/MAPK) is aktiválja (Vántus et al. 1995, 2001). A lassan kifejlődő tirozin-kináz gátlás a TT-232 tumorelles hatásában is fontos szerepet játszhat (Kéri et al. 1993, 1996).

A gyulladásos reakciók kialakulása után történő egyszeri kezelések is jelentősen gátolták a carbachollal kiváltott bronchokonstriktiót, amely azt jelzi, hogy a hiperreaktivitást csökkentő hatásuk –legalábbis részben- a gyulladásgátló hatástól függetlenül alakult ki. Mindezek alapján stabil, endokrin hatásoktól mentes, szelektív sst₄ receptor agonisták új perspektívákat jelenthetnek a légúti gyulladások és a következmények hiperreaktivitás kezelésében.

I. 6. A TÉMAKÖRBE BEMUTATOTT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Eredményeink igazolták, hogy egérben endotoxinnal kiváltott szubakut légúti gyulladásban a gyulladásokeltő szenzoros neuropeptidek (SP és CGRP) tüdőbeli koncentrációja megnövekedik. Bizonyítottuk, hogy e peptidek gyulladásos mediátorok hatására a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből szabadulnak fel, mivel ezen afferensek RTX előkezeléssel történő inaktivációja után nem fokozódik a mennyiségük a gyulladásos folyamat következtében. Az előkezelés a SP és a CGRP ép tüdőben mért alapkonzentrációit nem változtatta meg, amelyből arra következtethetünk, hogy e peptidek egyéb sejtekben (pl. epithel- és kötőszöveti sejtek) is szintetizálódnak. Bizonyítékot szolgáltatunk továbbá arra, hogy bár e szenzoros neuropeptidek szerepet játszanak az LPS-sel kiváltott granulocita-akkumulációban és gyulladásos citokintermelésben, a kapszaicin-érzékeny afferenseknek összességében jelentős gyulladásgátló hatás tulajdonítható. Receptor-specifikus antagonistáik segítségével igazoltuk, hogy az NK₂ receptoroknak van meghatározó szerepe a gyulladásos légúti hiperreaktivitásban.

2. Igazoltuk, hogy intranazális LPS-kezelést követően TRPV1 KO egerekben súlyosabb légúti gyulladásos reakció és fokozódó bronchiális hiperreaktivitás alakul ki, melynek hátterében az áll, hogy e receptor hiányában a gyulladásgátló hatású szomatosztatin felszabadulása elmarad. A szomatosztatin funkcionális jelentőségét az sst receptor antagonistá C-SOM, illetve az agonista SOM-14 segítségével bizonyítottuk.

3. Molekuláris biológiai, immunhisztokémiai és western blot módszerekkel elsőként bizonyítottuk az sst₄ receptor jelenlétét egér és emberi tüdőben egyaránt, elsősorban a bronchusok/bronchiolusok epithelsejtjein, vaszkuláris endothelsejteken, a hörgők és az erek simaizomsejtjein, valamint az alveoláris szeptumokban található fibrocitákon. Endotoxinnal kiváltott gyulladás hatására egérben kétszeresére emelkedett az sst₄ receptorfehérje mennyisége a jelentős sst₄ immunpozitivitást mutató aktivált makrofágok, limfociták és granulociták beáramlásának köszönhetően. Emberi tüdőben az sst₄ receptor expressziója és lokalizációja nagyfokú hasonlóságot mutatott az egérben tapasztaltakkal. Gyulladt tüdőben az sst₄ expresszió a gyulladás típusától, mechanizmusától és a domináns sejtípustól függ. Makrofág és limfocita dominanciával járó krónikus bronchitiszben az expresszió nagymértékben fokozódott, a neutrofil sejtakkumulációval járó akut purulens bronchopneumóniában azonban nem volt különbség. Az emberi makrofágok és limfociták az egérhez hasonlóan sst₄ immunpozitívak, azonban emberben a granulociták nem hordozzák e receptort. Az sst₄ expressziójának emberi és egértüdőben tapasztalt hasonlósága arra utal, hogy e receptor szerepére vonatkozóan az egérmodellekben nyert eredmények jól extrapolálhatók emberi légúti gyulladásos folyamatokra.

4. Sst₄ receptor génhányos egerek segítségével, morfológiai, kémiai, immunológiai és funkcionális vizsgálatokkal bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a kapszaicin-érzékeny afferensekből felszabaduló szomatosztatin a tüdőben az sst₄ receptorokon keresztül fejti ki gyulladás és hiperreaktivitást gátló hatásait. Ezek a kísérletek az első vizsgálatok sst₄ receptor knockout egereken.

5. Igazoltuk, hogy az sst₄/sst₁ receptor agonista heptapeptid TT-232 és az sst₄ szelektív peptidomimetikum J-2156, hatékonyan gátolja a légúti gyulladást és a következményes hiperreaktivitást az endotoxinnal kiváltott akut és az ovalbuminnal kiváltott krónikus egérmodellekben, melynek alapján új terápiás lehetőséget nyújthatnak a tüdő gyulladásos betegségeinek kezelésében.

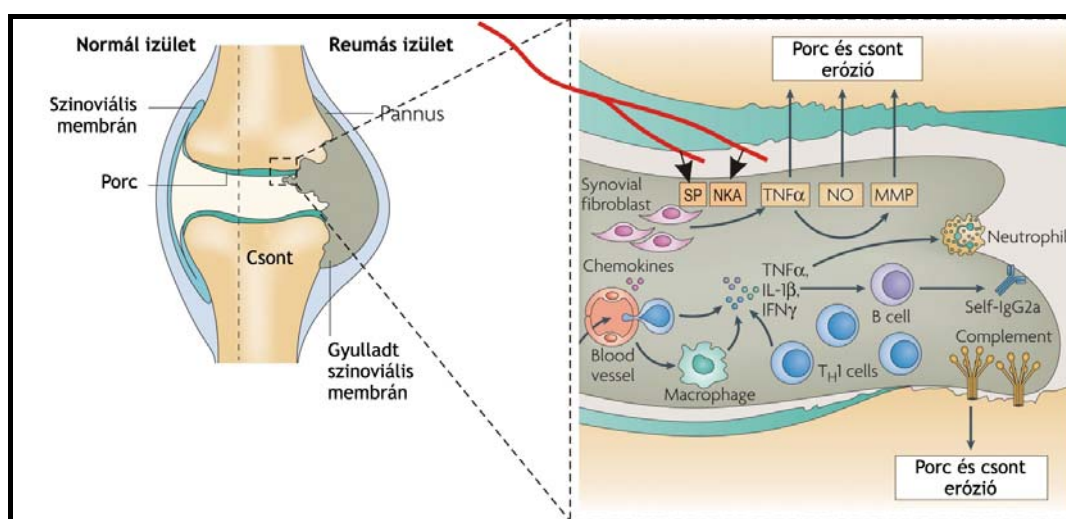
II. TÉMAKÖR

A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY IDEGVÉGZŐDÉSEK, A TRPV1 ÉS SST₄ RECEPTOROK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA KRÓNIKUS ÍZÜLETI GYULLADÁS MODELLJÉBEN

II. 1. BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK

Az ízületi tok és a szinovium a légutakhoz hasonlóan ugyancsak gazdagon innervált kapszaicin-érzékeny szenzoros rostokkal. Ezen idegvégződés a feszülést és a fájdalmat közvetítik, valamint számos irodalmi adat igazolja, hogy az általuk közvetített neurogén gyulladás jelentős szerepet játszik a napjainkban népbetegségnek számító, egyre növekvő számú beteget érintő krónikus ízületi gyulladásos megbetegedések, mint pl. a reumatoid arthritisz, kialakulásában és súlyosbodásában (Jorgenson és Sany 1994). A reumatoid arthritisz elsősorban a fiatal, középkorú nőket érinti, hazánkban mintegy 70-80 ezer pácienssel számolhatunk. Ez a kórkép egy autoimmun hátterű, krónikus, progresszív sokízületi gyulladás, mely az ízületek destrukciója és deformitása révén a betegek fájdalmát, mozgáskorlátozottságát, rokkantságát és életminőségük jelentős romlását idézi elő (Harris 2005). A gyulladt ízületre a szinoviális szövet megvastagodása, a mononukleáris sejtek infiltrációja, valamint porc- és szubkondrális csontdestrukció jellemző. A gyulladásos citokinek fontos szerepet játszanak az arthritisz kialakulásában és progressziójában. Az IL-1 β aktiválja a T-sejteket és az oszteoklasztokat (Kagari et al. 2002). Az IL-6 és a TNF- α a T- és B-sejtek proliferációját, differenciációját és csontabszorpciót okoznak. A TNF- α központi szerepet játszik az autoimmun gyulladás kialakulásában más proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelésének fokozásával, a leukocita-adhézió, migráció, az angiogenezis, valamint a porc- és csontdestrukció serkentésével. Ezek a citokinek az elmúlt 15 évben biológiai terápiás célmolekulákká váltak. Mindemellett több irodalmi adat is felhívja a figyelmet a neuro-immun interakciók jelentőségére a reumatoid arthritisz patomechanizmusában (Niissalo et al. 2002; o'Connor et al. 2004). Arthritiszben szenvedő betegektől (Marabini et al. 1991; Larsson et al. 1991), illetve kísérleti állatoktól (Bileviciute et al. 1993) származó szinoviális folyadékban a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidek emelkedett szintjét mutatták ki. A tachikinek és CGRP magukon az idegvégződéseken, az

ereken, a szinoviális sejteken, valamint az ízületi gyulladásos sejteken történő hatással jelentősen hozzájárulnak a gyulladásos reakció és a következményes fájdalom kialakulásához (Levine et al. 1985; Ferrel és Lam 1996). A SP a hízósejtekből gyulladásokeltő mediátorokat szabadít fel, stimulálja továbbá a makrofágok IL-1 β , TNF- α és interferon- γ (INF- γ) termelését, valamint a szinoviociták prosztaglandin E₂, kollagenáz, nitrogén monoxid (NO), és mátrix metalloproteináz (MMP) szekrécióját. A T- és B-limfociták aktivációja a makrofágokból származó gyulladásos citokineknek köszönhető (Lam és Ferrell 1991; o'Connor et al. 2004; Gonzalez-Rey et al. 2007; **II/1. ábra**). A CGRP elsősorban a szinoviális értágulat, ödémaképződés és az artritiszhez kapcsolt fájdalom, hiperalgécia kialakulásában játszik szerepet (Fernihough et al. 2005; Saxler et al. 2007). A spontán fájdalom, az allodinia, azaz a nem fájdalmas ingerekre kialakuló fájdalomérzet, valamint a fájdalomküszöbcsökkenés (hiperalgécia) az emberi ízületi gyulladásos betegségek minden fajtájának jellemző tünetei. A nociceptorok aktivációját és/vagy szenzitizációját a felszabaduló gyulladásos mediátorok, mint pl. protonok, lipoxigenáz termékek, prosztaglandinok és a bradikinin idézhetik elő. A SP és a CGRP a periférián és szenzoros neuronok gerincvelői centrális végződésein hatva egyaránt szerepet játszanak a nocicepcióban is. A krónikus ízületi gyulladás és a következményes fájdalom tehát nagyon komplex, sokrétű folyamat eredménye, amelyben a szenzoros-immun interakciók rendkívül fontosak: a tachikininek stimulálják a gyulladásos sejteket, a belőlük felszabaduló mediátorok viszont különféle mechanizmusokkal aktiválják, szenzitizálják a nociceptorokat.



II/1. ábra. Krónikus ízületi gyulladás és a szerepet játszó mediátorok sematikus vázlata
(Gonzalez-Rey et al. 2007 nyomán)

Arra is van azonban irodalmi és saját adatunk is, hogy más, ugyancsak az aktivált szenzoros idegvégződésekből felszabaduló neuropeptidek kísérleti körülmények között gátolják a

krónikus ízületi gyulladás kialakulását. Ilyenek például az opoid peptidek (Parsons et al. 1990), a galanin (Heppelmann et al. 2000), a VIP (Delgado et al. 2002) és a PACAP (Delgado et al. 2003). Saját kísérleteink más modellekben, a bőrben és a légutakban elsősorban a kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló szomatosztatin gyulladásgátló és antinociceptív hatásaira irányultak (Helyes et al. 2003). Számos bizonyíték van arra, hogy az ízületbe adott SOM fájdalomcsillapító hatással rendelkezik és hatékonyan csökkenti a gyulladásos folyamatokat artritiszben szenvedő betegekben (Fioravanti et al. 1995; Matucci-Cerinic és Marabini 1998; Sanake és Suzuki 1998). Ízületi gyulladás vonatkozásában tehát –hasonlóan az előző témakörben ismertetett légúti gyulladásos folyamatokhoz- a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló mind gyulladás-keltő, mind gyulladás-gátló hatású neuropeptidek patofiziológiai jelentőségére is vannak irodalmi adatok.

A krónikus ízületi gyulladásos betegségek jelenlegi terápiája elsősorban a tünetek enyhítésére szolgál. Így kezdetben nem-szteroid típusú gyulladás-csökkentők/fájdalomcsillapítók javasolhatók, míg előrehaladottabb betegségben szteroidok, később az immunszuppresszív hatású bázisterápiás gyógyszerek (methotrexát, leflunomid) adandók. Ezen gyógyszerek viszont súlyos gasztrointesztinális, renális és hematológiai mellékhatásaik miatt óvatosságra intik a kezelőorvost, továbbá nem minden beteg reagál kielégítően ezekre a farmakoterápiás beavatkozásokra. Napjainkra egyre elterjedtebb a biológiai terápia, melynek célja, hogy megakadályozza specifikus citokinek (TNF- α , IL-1 β) termelődését, hatásait, a gyulladásos sejtek proliferációját, működését, és így visszaszorítsa a gyulladásos folyamat progresszióját, az ízület további károsodását (Disease Modifying Anti-Rheumatoid Drugs: DMARDs). Bár ezek a szerek valóban jelentősen csökkentik a progressziót, alkalmazásuk során az immunrendszer gyengülése miatt fokozott fertőződésveszéllyel és fakultatív patogén kórokozókkal történő infekciókkal kell számolni, valamint hosszútávon a másodlagos malignitások kialakulásának magasabb kockázata sem zárható ki (Feldmann et al. 2005). E betegségcsoport kezelése tehát korántsem megoldott, és egyetlen olyan gyógyszer sincs forgalomban, amely hatékonyan tudná gátolni a gyulladásos folyamat neurogén komponensét (Helyes et al. 2003).

II. 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Ebben a témakörben bemutatott első kísérletsorozatunkban a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéses krónikus ízületi gyulladásban és következményes hiperalgégiában betöltött szerepét vizsgáltuk a reumatoid arthritisz patkánymodelljében RTX-előkezelés segítségével.
2. Célunk volt ezen túlmenően ezeken az érzőrostokon lokalizálódó TRPV1 ioncsatorna szerepének és aktivációjának vizsgálata krónikus arthritisz modellben receptor génhiányos egerek segítségével.
3. Mivel krónikus arthritiszben is sikerült igazolnunk a kapszaicin-érzékeny rostokból felszabaduló szomatosztatin gyulladásgátló és antinociceptív hatásait, a továbbiakban az sst₄ szomatosztatin receptor szerepét vizsgáltuk e modellben génhiányos egerek felhasználásával.
4. Végül az előző eredményeink alapján a témakör utolsó célkitűzése szintetikus sst₄ receptor agonista vegyületek, a heptapeptid TT-232 és a peptidomimetikum J-2156, gyulladásgátló és antinociceptív hatásainak vizsgálata volt krónikus ízületi gyulladásmodellben.

E célok megvalósításához a reumatoid arthritisz nemzetközileg elfogadott és széles körben alkalmazott kísérletes modelljét, a komplett Freund-adjuvánssal (CFA) kiváltott krónikus ízületi gyulladásmodellt használtuk patkányban és egérben. A feltett kérdésekre funkcionális (duzzadásmérés, mechanonociceptív küszöbmérés), morfológiai (fénymikroszkópos szövettani vizsgálatok) és biokémiai/immunológiai (plazma szomatosztatin koncentrációjának mérése radioimmunoassay-vel, gyulladásokeltő citokinek meghatározása ELISA-val) módszerekkel kerestük a választ.

II. 3. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

II. 3. 1. A KÍSÉRLETI MODELL

Állatok

A kísérleteket hím Lewis patkányokon, TRPV1^{-/-} és C57Bl/6 WT egereken, CD1, valamint sst4^{-/-} és sst4^{+/+} egereken végeztük. Az állatok származását az előző témakörben ismerttettem, tenyésztésük intézetünk állatházában történt. A krónikus ízületi gyulladásmodell kivitelezésére és a vizsgálati módszerekre vonatkozó etikai elvek megegyeztek a légúti gyulladás kísérleteknél leírtakkal.

A krónikus ízületi gyulladásmodell

A krónikus ízületi gyulladást komplett Freund adjuvánssal (elölt Mycobacterium paraffinolajos szuszpenziója, 1 mg/ml) váltottuk ki (100 µl patkányban, 50 µl egérben s.c. a bal talpba és a faroktőbe). A szisztémás tünetek elősegítésére a faroktőbe adott injekciót a következő napon megismételtük, ezt tekintettük a kísérlet első napjának. A CFA hatására az injekció oldalán sokkal kifejezettebb, de az ellenoldalon is megfigyelhető gyulladásos reakció alakul ki a tibiotarzális ízületekben, amelyet szisztémás gyulladásos tünetek (testhőmérséklet-emelkedés, étvágytalanság, testsúlycsökkenés, bágyadság) kísérnek. A CFA adásával a szervezet immunválasz-készsége stimulálható, a baktérium sejtfalában található muramildipeptid aktiválja a makrofágokat és a dendritikus sejteket, amely IL-12, IL-6, TNF-α, IFN-γ fokozódó termeléséhez vezet. Ennek hatására poliklonális T-limfociták aktiválódnak, elsősorban T-helper1 (Th₁, CD4⁺) irányba differenciálódnak és limfokineket termelnek. Az adjuváns alkalmazásának helyén a sajtos granulóma képződéséért a makrofágok fokozott mértékű antigén-feldolgozása felelős, a krónikus poliarthritis kialakulásában CD4⁺ T-sejt klónok aktiválódása játszik szerepet (Joe és Wilder 1999; Billiau és Matthys 2001).

Az ízületi gyulladás kiváltása után 3 héten keresztül kétnaponta mértük a lábak térfogatát és a talp érintési érzékenységi (mechanonociceptív) küszöbét, egyes kísérletsorozatokban a spontán terhelést is. A duzzadást, a hiperalgéziát és a terheléscsökkenést százalékos formában fejeztük ki a kísérlet előtti kezdeti értékekhez viszonyítva. A patkánykísérletek végén mély altatásban szívpunkcióval 4 ml vért vettünk, ebből RIA-val szomatosztatin-szerű immunreaktivitást határoztunk meg. A tibiotarzális ízületekből készült metszeteken

szemikvantitatív morfológiai értékelést végeztünk. Az egérkísérletekben az ízületi homogenizátumokból ELISA-val gyulladásos citokineket is mértünk.

Alkalmazott előkezelések, kezelések

a.) Az első kísérletsorozatban a kapszaicin-érzékeny afferensek szerepének vizsgálata céljából a patkányok egy csoportját a TRPV1 agonista RTX-szel kezeltük elő, amely ezen érzőidegvégződések hosszantartó károsodását okozza. Az előkezelés az előző témakörben ismertetett módszerhez hasonlóan történt: az állatoknak 3 egymást követő napon 30, 70 és 100 µg/kg RTX-et adtunk s.c. a nyakbőr alá, az akut hatásból adódó szövődmények kivédésére minden alkalommal az RTX előtt 20 perccel i.p. terbutalin-teofillin-atropin koktélt is injektáltunk. Az ízületi gyulladást 7 nappal később váltottuk ki. Az RTX deszenzibilizáció sikerességének ellenőrzésére a kísérlet megkezdése előtt ebben a sorozatban is elvégeztük kapszaicin szembe cseppentésével a wiping tesztet, az elhárító reakció minden általunk előkezelt állatban hiányzott. A patkányok egy másik csoportjának az sst receptor antagonistá C-SOM-ot naponta injektáltuk a 21 napos periódus alatt (20 µg/kg i.p.).

b.) Krónikus ízületi gyulladás egérmodelljében a lipoxigenáz-termékek TRPV1 receptor aktiválásában betöltött szerepének vizsgálatára egy állatcsoportot minden nap a nem-szelektív lipoxigenáz inhibitor nordihidroguarénsavval (NDGA; 25 mg/kg, i.p) kezeltünk. Egy másik csoportot a bradikinin B₁ receptor antagonistá desArgHOE-140-nel, egy harmadikat pedig a bradikinin B₂ receptorát blokkoló HOE-140-nel kezeltük naponta (mindkét anyag 250 µg/kg i.p.). A negyedik csoportban az egerek a nem-szelektív ciklooxygenáz-gátló indometacint kapták (1 mg/kg i.p.) a teljes kísérleti periódus alatt.

c.) A következő kísérletsorozatban a patkányokat a szintetikus heptapeptid sst₄/sst₁ agonista TT-232-vel kezeltük a teljes kísérlet alatt (2x50-400 µg/kg/nap i.p.), a kontroll csoportban oldószert alkalmaztunk. Az alkalmazott dózistartományt előzetes *in vitro* és *in vivo* kísérleteink alapján választottuk (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002; Helyes et al. 2005).

A szelektív sst₄ receptor agonista peptidomimetikum J-2156 két dózisát (1 és 10 µg/kg) napi háromszor injektáltuk i.p. a teljes kísérleti periódus alatt, oldószerként 0.9%-os NaCl-t használtunk. Ezeket a dózisokat a J-2156 *in vitro* kísérletekben meghatározott hatásere ssége és akut gyulladásmodellekben nyert eredményeink alapján választottuk (Helyes et al. 2006). Minden csoportban 6-12 állatot használtunk.

II. 3. 2. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A lábtérfogat mérése

A lábak térfogatát Ugo Basile pletizmométerrel mértük, amely a közlekedőedények elve alapján működő készülék. Az állat hátsó lábát a bokaízület felett előre meghatározott jelig egy folyadékkal teli hengerbe merítettük, patkányokhoz nagyobb, egerekhez kisebb térfogatú tartályt használtunk. Ehhez a hengerhez csatlakozik egy másik folyadékkal teli henger, amelyben egy transzducer a láb bemerítésekor bekövetkező folyadékkiszorítást érzékeli. A térfogatot cm^3 -ben olvastuk le a digitális kijelzőről, a mérési adatokat a kezdeti értékekhez viszonyítottuk és az ödémát százalékban fejeztük ki (II/2. ábra).



II/2. ábra: Patkány és egér lábtérfogatának mérése Ugo Basile pletizmométerrel

A talp érintési érzékenységének mérése

A talp mechanocéptív küszöbének meghatározását Ugo Basile dinamikus plantáris eszteziométerrel végeztük, amely a klasszikus von Frey módszer digitalizált változata. A vizsgálat alatt az állatok szabadon mozogtak egy fémrácsra helyezett kamrában, amelyben a méréseket egy 10-15 perces szoktatási periódus után végeztük. A mozgatható stimulátor egységhez csatlakoztatott tűk segítségével a talp középső régiója egy rozsdamentes acélból készült tompa tűkével alulról ingerelhető előzetesen beállított dinamikai paraméterekkel. Patkányok mérésekor a maximális erő kifejtést 50 g-ra, az erő kifejtés növelésének sebességét (ramp) 10 g/s-ra, egerek esetében a maximális erőhatás 10 g-ra, az erőhatás növekedési dinamikáját 2 g/s-ra állítottuk be. A készülék digitális kijelzőjén g-ban leolvasható az a küszöbérték, amelynél az állat felemeli a lábát (II/3. ábra). Ép patkánylábban ez a stimulus alapvetően nem fájdalmas, a küszöbérték érintési érzékenységi küszöbnek tekinthető. Egérben

ezzel szemben ez intakt állapotban is enyhén fájdalmas ingert jelent, tehát az elhárító reakció a mechanonociceptív küszöböt jelzi. Minden eredményt 3 egymás utáni mérés átlagából számoltunk, a mechanikai küszöb változását (patkányban allodinia, egérben hiperalgézia) a saját kezdeti értékhez viszonyított százalékban fejeztük ki.



II/3. ábra. Talp érintési érzékenységeinek meghatározása Ugo Basile dinamikus plantáris eszteziométerrel

Spontán végtagterhelés vizsgálata

A súlyeloszlás méréséhez incapacitance testert (Linton Instruments) használtunk, mely a spontán fájdalom megítélésére alkalmas. Az állatokat nyugalomban mellső lábaikkal a plexiketrec alapjával 45 fokos szöget bezáró felületre tesszük, hátsó végtagjaik alatt két kis mérleg helyezkedik el. Intakt állapotban a két oldal terhelése azonos, a spontán súlyeloszlás ekkor 50-50%. Fájdalom esetén az érintett végtag kímélése miatt ez eltolódik a másik terhére.

A plazma szomatosztatin koncentrációjának meghatározása

A plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitását az előző témakörben is bemutatott RIA módszerrel határoztuk meg (Németh et al. 1996, 1998). A kísérlet végén, 21 nappal a CFA-injekció után, 12 órás éheztetést követően patkányonként 4 ml vérmintát vettünk szívpunkcióval mély altatásban EDTA-t és aprotinint tartalmazó jégbehűtött csövekbe. Centrifugálást követően a plazmák peptidtartalmát abszolút alkohollal extraháltuk, majd második a centrifugálás után a felülúszót nitrogén áram alatt beszárítottuk és RIA-pufferben visszaoldottuk.

Szövetteni metszetek készítése és értékelése

A vérvételt követően cervikális diszlokációt végeztünk, majd a tibiotarzális ízületeket kimetszettük. A mintákat ezután formalinban fixáltuk, majd 8 órán keresztül AlCl_3 -ot, hangyasavat és sósavat tartalmazó oldatban dekalcináltuk 4°C -on (Schwab et al. 1997; Helyes

et al. 2004). Amikor az ízületek megfelelően felpuhultak, Sørensen-féle foszfát-pufferben 8 órán át mostuk, majd megint 8-8 óráig 4°C-on szacharóz-oldatokban dehidráltuk. Végül a mintákat paraffinba ágyztuk, majd mikrotómmal 5-7 µm-es szeletekre vágtuk és hematoxin-eozin eljárással megfestettük. Az egyes ízületek 4-5 különböző rétegéből készült metszet, hogy átfogóbb képet kapjunk az ízületben lezajlott elváltozásokról.

A gyulladásos elváltozásokat egy kísérleteinktől független tapasztalt patológus kolléga értékelte. A szemikvantitatív pontozás a *szinoviális kötőszövet megvastagodása*, *leukocitás infiltrációja*, valamint a *porc- és csontkárosodás* mértéke alapján történt. Mind a négy paramétert 0-tól 3-ig terjedő skálán pontoztunk, ahol 0=normális, 1=enyhe, 2=mérsékelt, 3=súlyos. Az egyes pontokat összeadtuk, így minden mintára, ezáltal minden csoportra, egy összetett artritisz pontszámot kaptunk (Weinberg et al. 2003).

Gyulladásos citokinek ízületi koncentrációjának meghatározása

Az egérkísérletekben a tibiotarzális ízületek tömegét lemértük, majd 4°C-on steril RPMI-PMSF pufferben homogenizáltuk. Centrifugálás után a felülúszók IL-1β és TNF-α koncentrációit a tüdőminták esetén ismertetett ELISA módszerekkel határoztuk meg.

Statisztikai értékelés

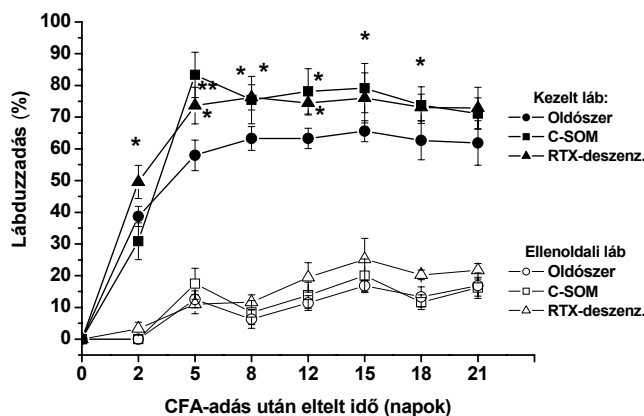
Az ödéma, allodinia/hiperalgécia, plazma szomatosztatin és citokin eredmények értékelésekor csoportonként n=6-12 állat átlag±SEM értékeit ábrázoltuk. A statisztikai elemzésre egyutas ANOVA-t követően Bonferroni-féle módosított t-tesztet használtunk, ahol *p<0.05, **p<0.01. Az összetett artritisz score ábrázolása az előző témakörhöz hasonlóan box plot módszerrel történt, a statisztikai elemzést nem-parametrikus variancia analízissel (Kruskal-Wallis) és Dunn-féle poszt tesztel végeztük, ahol szintén *p<0.05 és **p<0.01.

II. 4. EREDMÉNYEK

II. 4. 1. Fejezet: A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY ROSTOK ÉS A BELŐLÜK FELSZABADULÓ SZOMATOSZTATIN SZEREPE KRÓNIKUS ÍZÜLETI GYULLADÁS PATKÁNYMODELLJÉBEN

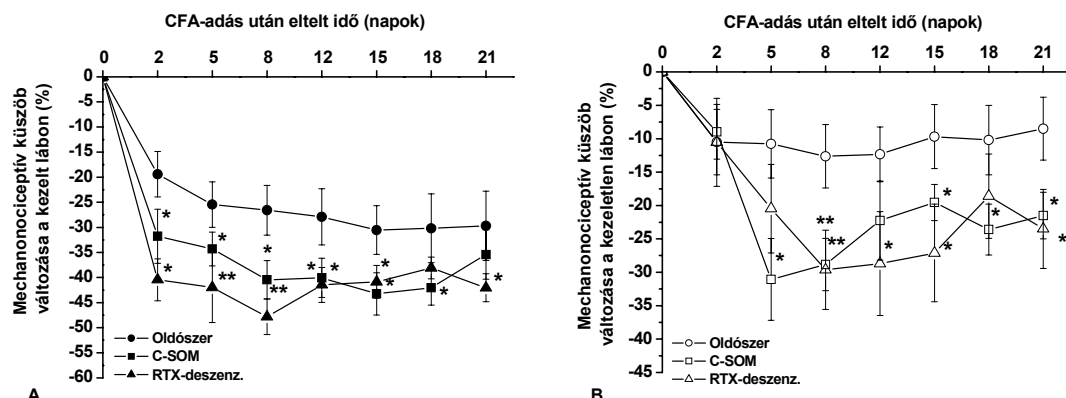
RTX-előkezelés és C-SOM hatása a lábduzzadásra és mechanikai allodiniára

Kontroll, előkezeletlen állatokban a CFA-val kezelt láb fokozatosan duzzadt, a 8. napon elérte a maximális 60%-ot, a térfogat $0.73 \pm 0.02 \text{ cm}^3$ -ról $1.18 \pm 0.13 \text{ cm}^3$ -re növekedett. Az ellenoldali lábon kisebb mértékű, csupán 16-18% ödéma volt tapasztalható. A kapszaicin-érzékeny afferens rostok RTX-előkezeléssel történő inaktivációja után az ödéma a teljes 21 napos kísérleti periódus alatt nagyobb volt, bár a különbség a második hét után már nem volt minden mérési pontban szignifikáns. A duzzadást fokozó tendencia az ellenoldalon is látható, de ott a kis ödéma értékek miatt szignifikáns eltérés nem tapasztalható. A naponta alkalmazott C-SOM injekció, amely a szomatosztatin hatásait mind az öt sst receptoron gátolja, az RTX-előkezeléshez hasonló mértékben fokozta a lábduzzadást (II/4. ábra).



II/4. ábra. RTX-előkezelés és C-SOM kezelés hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra (átlag \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. kontroll).

Az oldószerrel kezelt kontroll csoport esetén a mechanonociceptív küszöb a CFA-val kezelt lábon jelentősen, mintegy 25-30%-kal csökkent, míg az ellenoldali lábon csupán 5-7%-kal. Az RTX-előkezelés és a C-SOM-kezelés egyaránt mindkét lábon szignifikánsan növelte az allodiniát a teljes 21 napos kísérleti periódus alatt (II/5. ábra).



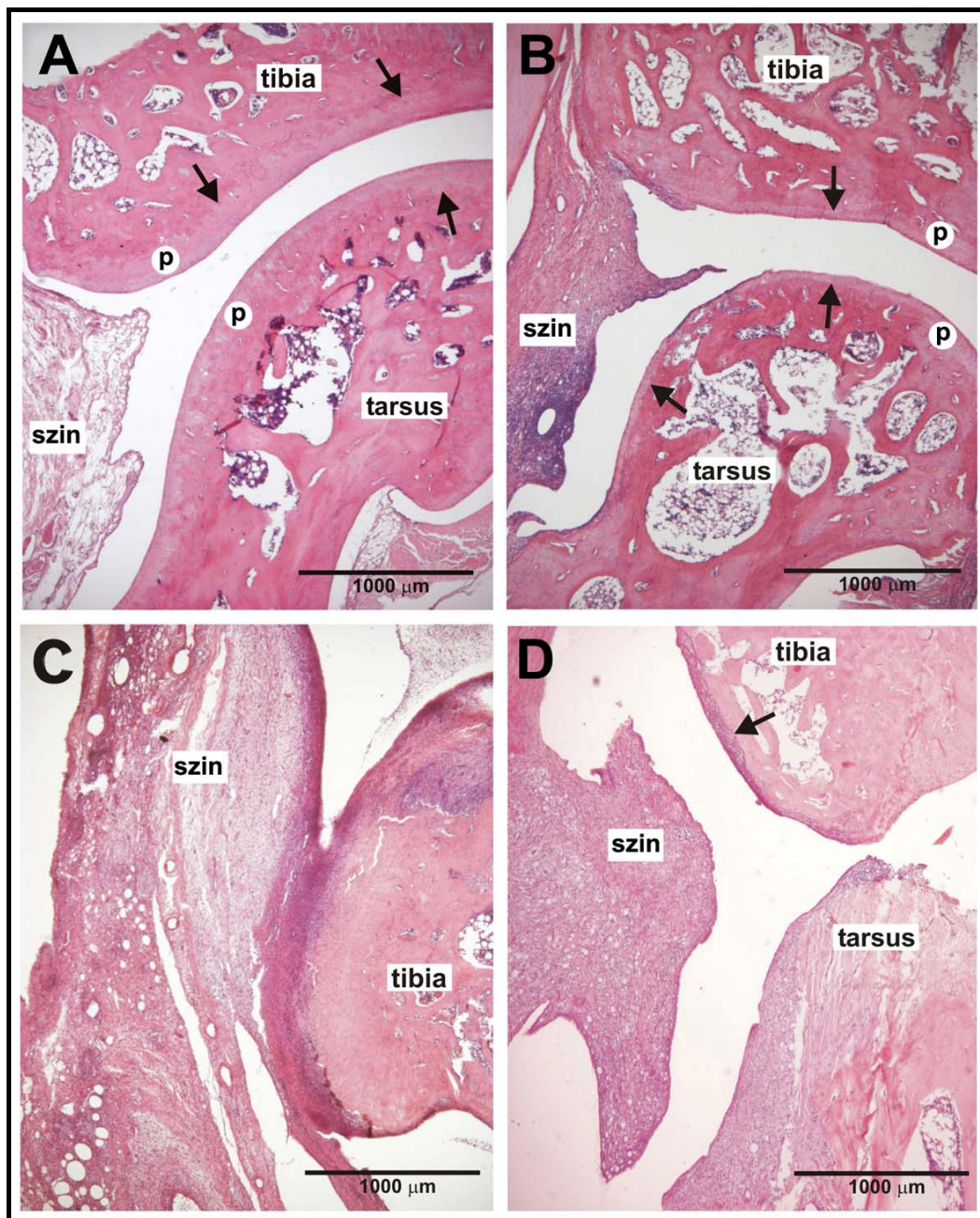
II/5. ábra. RTX-előkezelés és C-SOM kezelés hatása mechanikai allodiniára (A) a CFA-val kezelt és (B) az ellenoldali lábon (átlag \pm SEM; * p <0.05, **<0.01 vs. kontroll).

RTX-előkezelés és C-SOM-kezelés hatása a CFA-val kiváltott szövettani elváltozásokra

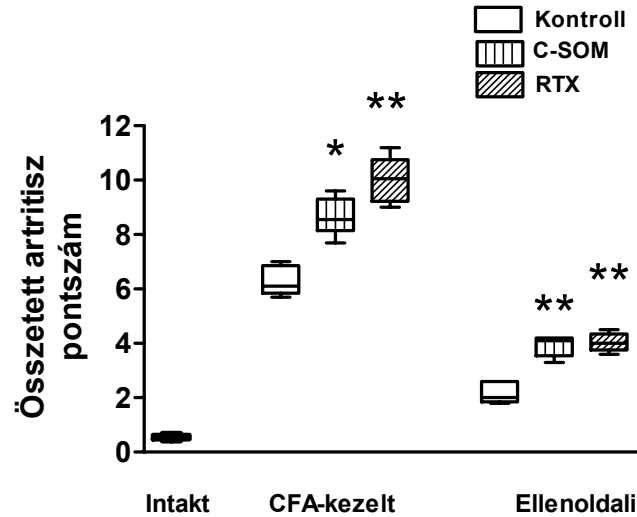
A szövettani metszeteken a normál ízületi struktúrával (**II/6. A. ábra**) összehasonlítva látható, hogy a CFA-val kezelt patkányok baloldali ízületét roncsolja az egyre növekvő szinoviális pannusz. Az ízületi üreg kiszélesedett, a szinoviális kötőszövet mononukleáris sejtekkel sűrűn infiltrált, a porcszövet nagymértékben lepusztult és erőteljes, masszív csontkárosodás figyelhető meg (**II/6. B. ábra**). Az ellenoldali ízületekben kisebb mértékű gyulladásos elváltozások láthatók, porc-és csontkárosodások ritkán jelentkeztek, a mononukleáris sejt-infiltráció jelentősen enyhébb, néhol a szinoviális szövet megvastagodott.

Az RTX-szel előkezelt és C-SOM-kezelt patkányok bal tibiotarzáris ízületében a CFA hatására sokkal kifejezettebb szinoviális hiperplázia, erőteljesebb megvastagodás és mononukleáris sejtes infiltráció, valamint nagyobb mértékű porckárosodás és előrehaladt csontpusztulás látható (**II/6. C.,D. ábrák**). Mindkét csoportban az ellenoldali ízületekben tapasztalt gyulladásos károsodások is sokkal intenzívebbek.

A független patológus segítségével történő szemikvantitatív elemzés és az ez alapján készített artritisz pontszám eredményei is alátámasztották, hogy mind az RTX-előkezelés, mind a C-SOM-kezelés szignifikánsan súlyosbította az ízületi gyulladást (**II/7. ábra**).



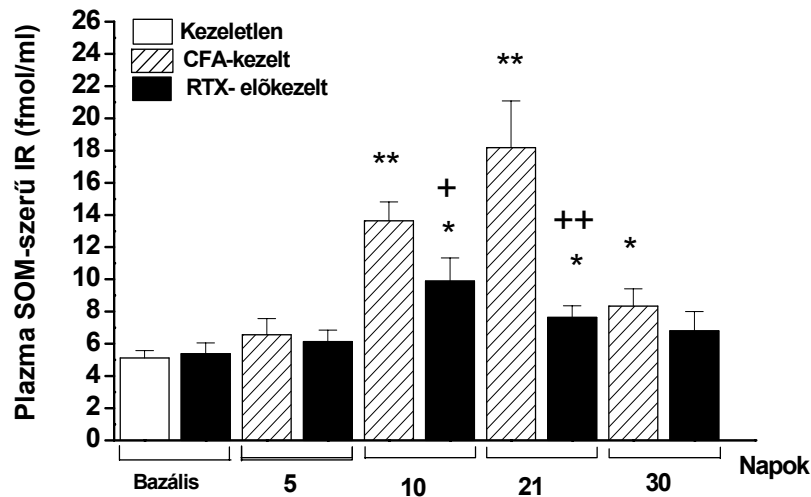
II/6. ábra. Szövettani metszetek, melyek bemutatják (A) egy ép tibiotarzális patkányízület szerkezetét, (B) egy gyulladt tibiotarzális ízület képét 21 nappal az i.pl. és a faroktöbe történő CFA-injekció után, (C) egy CFA-val kiváltott arthritisz képét RTX-előkezelés után, és (D) egy C-SOM-kezelt patkány gyulladt ízületét. HE festés, 200x-os nagyítás; [szin]: szinovium, [p]: porc.



II/7. ábra. A tibiotalaris ízületek szemikvantitatív szövettani értékelése (median \pm 25-75 percentil; * p <0.05, ** p <0.01 vs. kontroll).

A plazma SOM koncentrációjának változása CFA-val kiváltott ízületi gyulladásban

A plazma SOM-szerű immunreaktivitása a CFA-injekciót követően folyamatosan emelkedett, a 21. napra elérte a négyszeres, maximális értéket. Ezt követően csökkenni kezdett és a 30. napra a maximális érték felére esett vissza. Az RTX-előkezelés a gyulladás során történő SOM felszabadulást szignifikánsan csökkentette, a bazális szint nem változott (II/8. ábra).



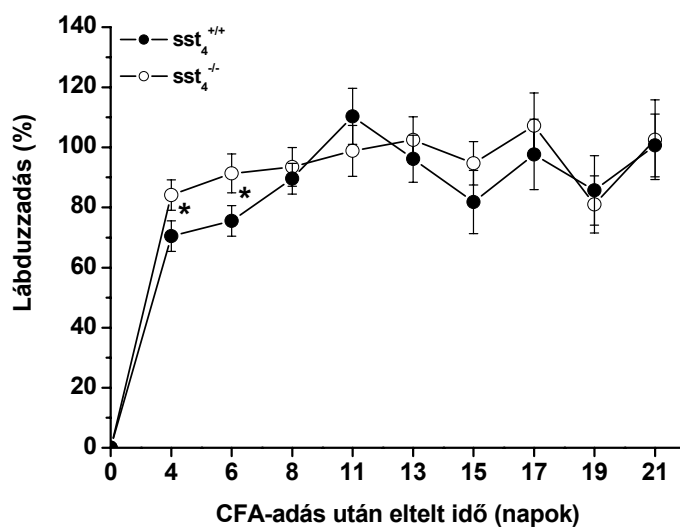
II/8. ábra. Plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitásának (IR) változása krónikus artritiszben (átlag \pm SEM; * p <0.05, ** p <0.01 vs. bazális; + p <0.05, ++ p <0.01 vs. CFA-kezelt).

II. 4. 2. Fejezet: AZ SST₄ RECEPTOR SZEREPE KRÓNIKUS ARTRITISZ EGÉRMODELLJÉBEN

Az előző fejezetben patkányokban bemutatott kísérleti modell egerekben történő alkalmazásakor az adjuváns-injekció oldalán hasonlóképpen kifejezett gyulladásos elváltozások tapasztalhatók, az ellenoldalon azonban jelentősen mérsékeltebbek a károsodás paraméterei. Ebben a fejezetben ezért csak az injekció oldalán mért változásokat mutatom be.

CFA-val kiváltott lábduzzadás sst₄^{+/+} és sst₄^{-/-} egerekben

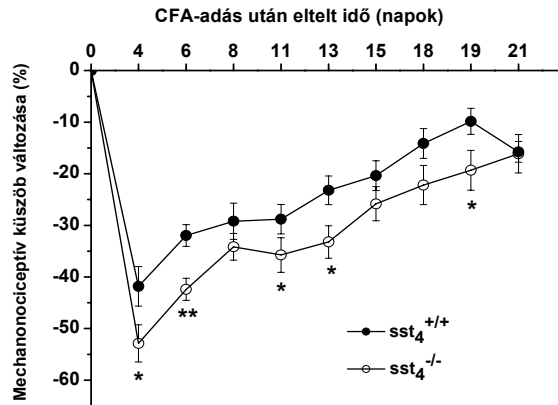
A 21 napos kísérleti periódus első hetében szignifikánsan nagyobb lábduzzadás alakult ki az sst₄^{-/-} egerekben, mint a vad típusú kontroll csoportban. A 4. napon a CFA-val kezelt oldalon az ödéma az sst₄^{+/+} egerekben kb. 70% volt, a lábtérfogat 0.32±0.02 cm³-ről 0.55±0.03 cm³-re növekedett. Ugyanezen a napon az sst₄^{-/-} állatokban a duzzadás 85% volt a kezdeti kontroll értékhez viszonyítva. Ez a szignifikáns különbség azonban a 8. naptól megszűnt (II/9. ábra).



II/9. ábra. CFA-val kiváltott lábduzzadás sst₄^{+/+} és sst₄^{-/-} egerekben (átlag±SEM; *p<0.05 vs. sst₄^{+/+} csoport).

Gyulladásos mechanikai hiperalgéria sst₄^{+/+} és sst₄^{-/-} egerekben

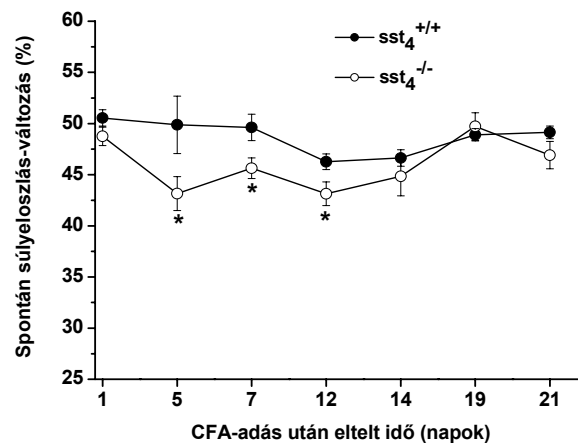
A krónikus gyulladás következtében kialakuló mechanikai hiperalgéria a talpon a vad típusú egércsoportban a maximális, kb. 40%-os, értéket a 4. napon érte el, ami a három hetes kísérleti periódus alatt folyamatosan csökkent. Az sst₄^{-/-} egerek hiperalgéria értéke szignifikánsan magasabb volt, a különbség az első héten kifejezettebb (II/10. ábra).



II/10. ábra. CFA-val kiváltott mechanikai hiperalgéria $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerekben (átlag \pm SEM; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. $sst_4^{+/+}$ csoport).

Spontán végtagterhelés-csökkenés $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerekben

A kísérlet kezdetén az intakt egerek közel azonos mértékben terheltek mindkét lábukat, tehát a súlyelosztás a két hátsó végtagon egyforma, közel 50-50%-os. A gyulladás előrehaladtával a kezelt láb terhelése mindkét csoportban csökkent. Az $sst_4^{+/+}$ állatokban az érintett végtag terhelés-csökkenése a kímélés érdekében maximálisan 47% volt, míg az $sst_4^{-/-}$ egerekben elérte a 42%-ot. Az $sst_4^{-/-}$ egerek a kísérleti periódus első szakaszában tehát kevésbé terheltek a gyulladt lábukat, amely összhangban áll a lábduzzadásban és a mechanikai hiperalgéziában tapasztaltakkal (II/11. ábra).

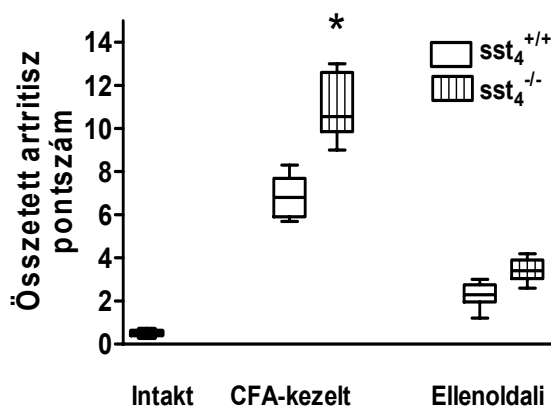


II/11. ábra. CFA-val kiváltott spontán végtag-terhelés-csökkenés $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerekben (átlag \pm SEM; * $p<0.05$ vs. $sst_4^{+/+}$).

CFA-val kiváltott szövettani elváltozások $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerekben

Az $sst_4^{-/-}$ egerek tibiotarzáris ízületeiben a CFA-kezelés oldalán sokkal nagyobb pannuszképződés és súlyosabb sejtes infiltráció volt megfigyelhető, az ízületi üreg

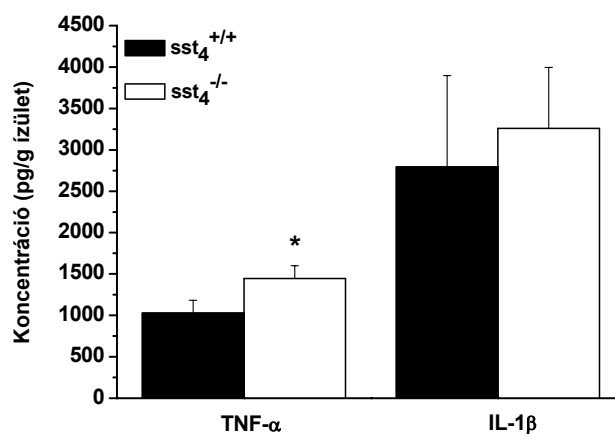
markánsabban kiszélesedett, kifejezettebb porcrétegapusztulás és jelentős csontszöveti károsodás volt látható. Az ellenoldalon tapasztalt enyhébb fokú károsodás is kissé súlyosabb volt az $sst_4^{-/-}$ csoportban, a különbség azonban ott nem volt szignifikáns (**II/12. ábra**).



II/12. ábra. A tibiotarzáris ízületek szemikvantitatív szövettani értékelése (median \pm 25-75 percentil; * $p < 0.05$ vs. $sst_4^{+/+}$).

Gyulladásos citokinek koncentrációja $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerek ízületi homogenizátumaiban

A $TNF-\alpha$ és az $IL-1\beta$ koncentrációja jelentősen megemelkedett 21 nappal a CFA i.pl. és faroktőben történő injekciója után az azonos oldali tibiotarzáris ízületek homogenizátumaiban. A $TNF-\alpha$ koncentrációja szignifikánsan magasabb volt az sst_4 receptor génhiányos állatcsoportban, mint a vad típusú kontrollokban. Ezzel ellentétben az $IL-1\beta$ mennyiségében nem volt számottevő különbség az $sst_4^{+/+}$ és $sst_4^{-/-}$ egerekben (**II/13. ábra**).



II/13. ábra. Gyulladásos citokinek koncentrációi tibiotarzáris ízületek homogenizátumában (átlag \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. $sst_4^{+/+}$ csoport).

II. 4. 3. Fejezet: SZINTETIKUS SST4 RECEPTOR AGONISTÁK HATÁSA KRÓNIKUS ÍZÜLETI GYULLADÁSMODELLEKBEN

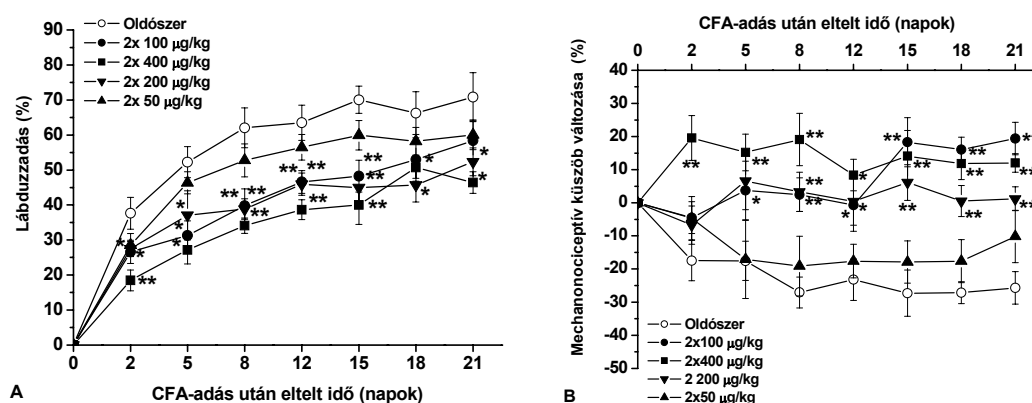
TT-232-kezelés hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra, a gyulladásos mechanikai allodiniára és az ízületi szövettani elváltozásokra patkányban

A TT-232 (2x50-400 µg/kg/nap i.p.) dózisfüggő módon csökkentette a CFA-val kiváltott lábödémát, a legnagyobb dózis 50%-os gátlást okozott a CFA-val kezelt lábon (**II/14. A. ábra**). A kontroll csoportban mért kb. 30%-os mechanikai allodiniát a nagyobb TT-232 dózisok kivédtek, sőt, meglepő módon küszöbemelkedést okoztak (**II/14. B. ábra**). Az ellenoldalon a duzzadás és a hiperalgéria teljesen megszűnt a napi kétszeri 200 és 400 µg/kg kezelés hatására, a 100 µg/kg is a legtöbb mérési pontban szignifikáns gátlást eredményezett.

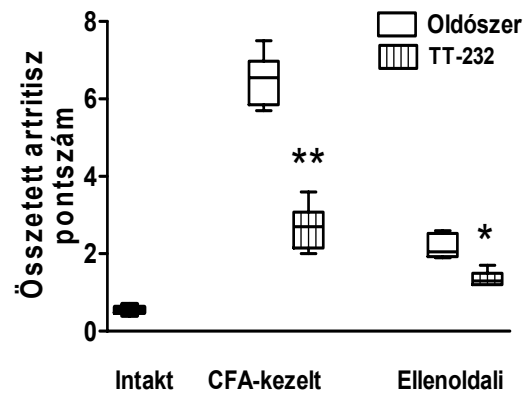
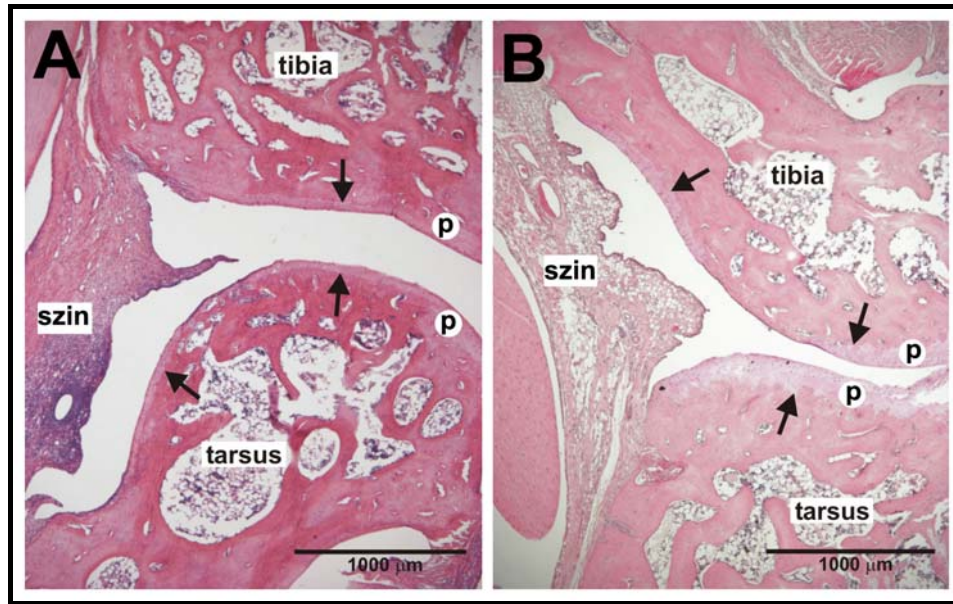
A napi 2x400 µg/kg i.p. TT-232-vel kezelt patkányok tibiotarzális ízülete jelentősen enyhébb gyulladásos jeleket mutatott. A szinoviális duzzanat, a limfocita-akkumuláció és a porcdestrukció csökkent, csontkárosodás egyáltalán nem jött létre (**II/15. A.,B. ábra**). Mindezt alátámasztja az összetett artritisz pontszám is, amely mindkét lábon szignifikánsan kisebb volt, mint az oldószerrel kezelt kontroll csoportban (**15. C. ábra**). A kisebb dózisok is csökkent szinoviális megvastagodást és mononukleáris sejtes infiltrációt eredményeztek.

TT-232-kezelés hatása a plazma szomatosztatin koncentrációjának emelkedésére

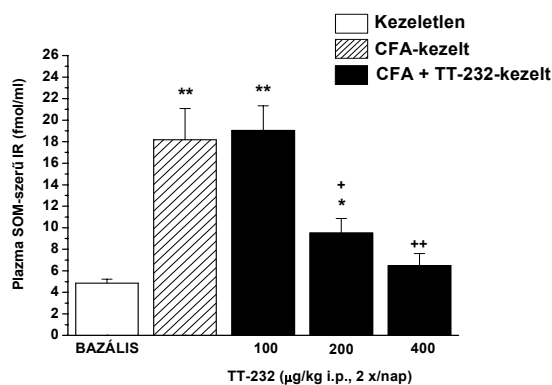
A teljes kísérleti periódus alatt napi kétszer i.p. injektált TT-232 dózisfüggő módon gátolta a plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitásának CFA-val kiváltott emelkedését. A legnagyobb dózis a bazális értékre csökkentette a szomatosztatin koncentrációt (**II/16. ábra**).



II/14. ábra. A TT-232 hatása a CFA-val kiváltott (A) lábduzzadásra és (B) gyulladásos mechanikai allodiniára a CFA-kezelt oldalon (átlag±SEM; *p<0.05 vs. sst₄^{+/+} csoport).



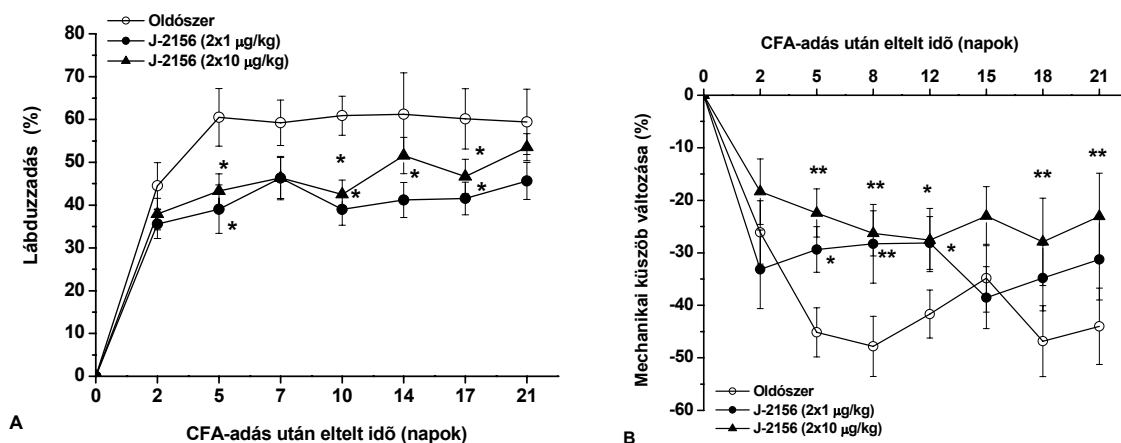
II/15. ábra. (A) Oldószerrel és (B) napi 2x400 µg/kg i.p. TT-232-vel kezelt patkány gyulladt tibiotarzáris ízületeinek szövettani képe 21 nappal az i.pl. és a faroktőbe történő CFA-injekció után (HE festés, 200x-os nagyítás; [szin]: szinovium, [p]: porc). (C) Szemikvantitatív szövettani értékelés (median±25-75 percentil; *p<0.05, **p<0.01 vs. oldószer (Kruskal-Wallis + Dunn poszt teszt).



II/16. ábra. A plazma CFA-val kiváltott szomatosztatin-szerű immunreaktivitásának (SOM-IR) változása tartós TT-232-kezelés hatására (átlag±SEM; *p<0.05, **p<0.01 vs. kezeletlen csoport, +p<0.05, ++p<0.01 vs. CFA-kezelt csoport).

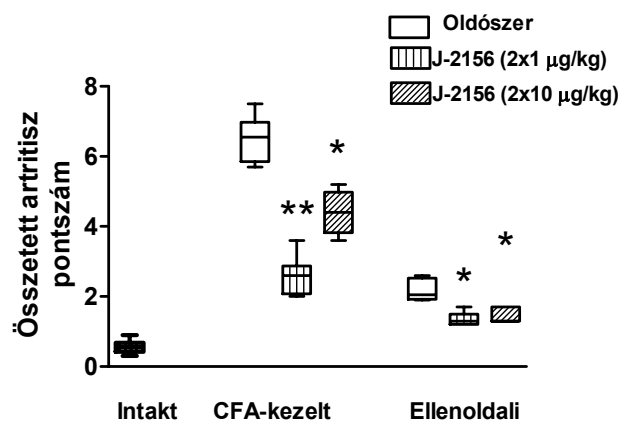
J-2156 kezelés hatása CFA-val kiváltott lábduzzadásra, hiperalgéziára és szövettani elváltozásokra egérben

Kontroll CD1 egerekben a kb. 60% lábduzzadást a J-2156 szinte minden mérési napon mindkét dózisban szignifikánsan csökkentette (**II/17. A. ábra**). Az 5. napra kialakuló 50%-os mechanikai hiperalgéziát a J-2156 ugyancsak jelentősen gátolta, bár a kisebb dózis szignifikáns hatása a 12. nap után megszűnt (**II/17. B. ábra**).



II/17. ábra: A J-2156 hatása a CFA-val kiváltott (A) lábduzzadásra és (B) gyulladásos mechanikai hiperalgéziára (átlag \pm SEM; * p <0.05, ** p <0.01 vs. oldószerrel kezelt csoport).

A teljes kísérlet alatt a naponta kétszer alkalmazott i.p. J-2156-kezelés jelentősen csökkentette a gyulladásos szövettani elváltozásokat mindkét végtagon, kisebb lett a szinoviális szövet megvastagodása és a mononukleáris sejtekkel történő infiltráltsága. Enyhébb porcdestrukció ugyan helyenként megfigyelhető volt, csontkárosodás azonban nem. A két alkalmazott dózis hatásában e paraméter tekintetében sem volt szignifikáns különbség (**II/18. ábra**).



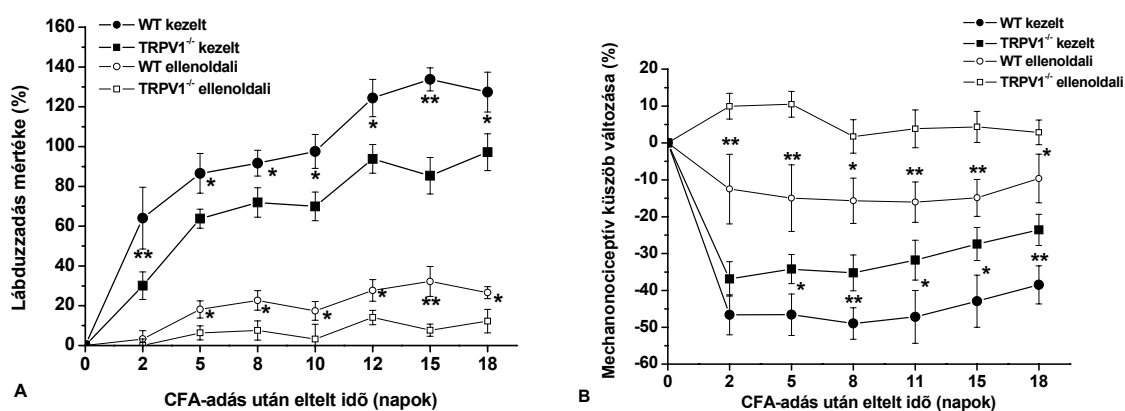
II/18. ábra. A J-2156 kezelés hatása a tibiotarzális ízületek CFA-val kiváltott szövettani elváltozásaira. (median \pm 25-75 percentil; n =6-8; * p <0.05, ** p <0.01 vs. oldószer).

II. 4. 4. Fejezet: A TRPV1 RECEPTOR SZEREPE KRÓNIKUS ARTRITISZ EGÉRMODELLJÉBEN

CFA-val kiváltott lábduzzadás, mechanikai hiperalgécia és szövettani elváltozások WT és TRPV1^{-/-} egerekben

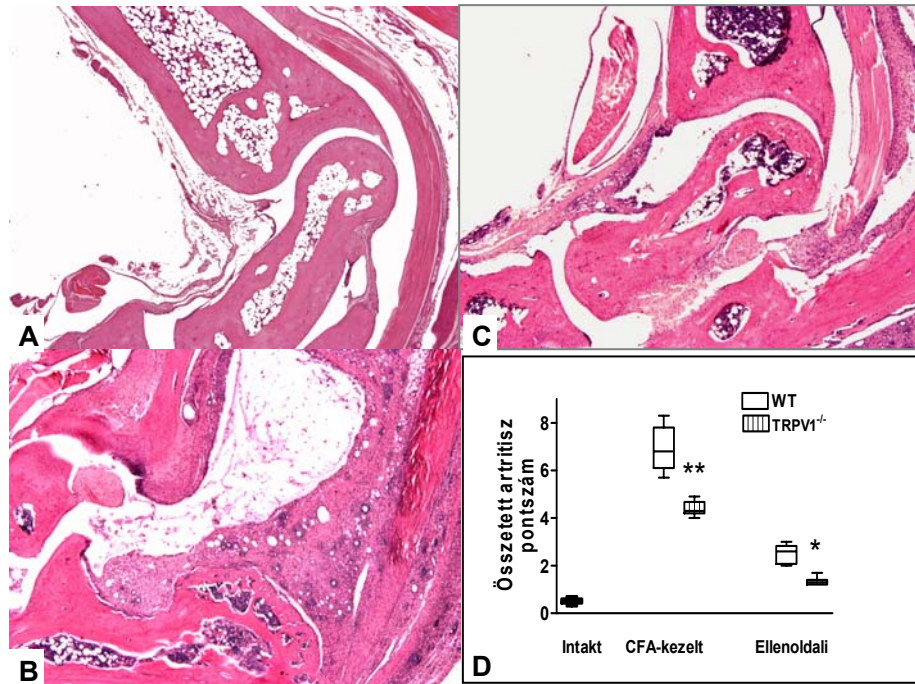
C57Bl/6 WT egerekben a kezelt oldalon a lábduzzadás folyamatosan növekedett, a 16. napon elérte a maximális duzzadást, az ellenoldali lábón kisebb ödéma alakult ki. A TRPV1^{-/-} egerek esetében mindkét oldalon szignifikánsan kisebb duzzadás alakult ki a teljes kísérleti periódus alatt (**II/19. A. ábra**). A vad típusú állatoknál a mechanonociceptív küszöb a CFA-val kezelt lábón 45-50%-kal csökkent, míg az ellenoldalon csupán 10-15%-os hiperalgécia alakult ki. Ezzel szemben a TRPV1^{-/-} egerek küszöbe csak 30-35%-os csökkenést mutatott a kezelt lábón, míg az ellenoldalon nem jött létre hiperalgécia (**II/19. B. ábra**).

A lábduzzadásban egértörzsek közti különbséget tapasztaltunk. Az ebben a sorozatban használt C57Bl/6 WT egerekben a CFA sokkal nagyobb (100-120%) duzzadást okozott, mint az előző fejezetben bemutatott sst4^{+/+} egerekben (60%), a hiperalgéciaiban, a szövettani károsodások súlyosságában és a citokin-koncentrációkban azonban nem volt lényeges eltérés.



II/19. ábra. CFA-val kiváltott (A) lábduzzadás és (B) mechanikai hiperalgécia WT és TRPV1^{-/-} egerekben (átlag±SEM; *p<0.05, **<0.01 vs. WT csoport).

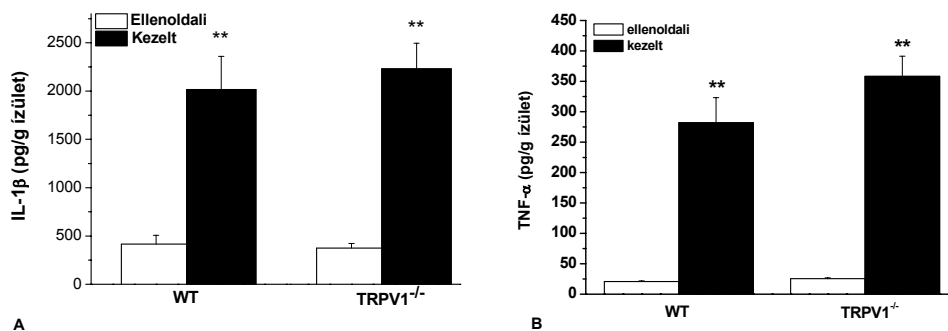
A szövettani metszeteken az ép ízületi szerkezettel (**II/20. A. ábra**) összehasonlítva a WT egerek CFA-val kezelt tibiotarzáris ízületeiben pannuszképződés figyelhető meg. Az ízületi üreg kiszélesedett, a szinoviális kötőszövet mononukleáris sejtekkel sűrűn infiltrált, a porcszövet nagymértékben lepusztult és jelentős csontdestrukció látható (**II/20. B. ábra**). A TRPV1^{-/-} egerekben kisebb mértékű porcdestrukció volt tapasztalható csontkárosodás nélkül, valamint a szinoviális szövet megvastagodása és mononukleáris sejtekkel történő infiltráltsága is enyhébb volt (**II/20. C.,D. ábra**).



II/20. ábra. (A) Intakt és (B) CFA-val kezelt WT és (C) TRPV1^{-/-} egerek bal tibiotarzális ízületeinek szövettani metszete (HE festés, 200x-os nagyítás) és (D) a szemikvantitatív pontozás (median±25-75 percentil; *p<0.05, **p<0.01 vs. WT).

Gyulladásos citokinek mennyisége WT és TRPV1^{-/-} egerek tibiotarzális ízületeiben

Az IL-1 β - és TNF- α -koncentrációk jelentősen megemelkedtek 21 nappal a CFA-injekció után mind a WT, mind a TRPV1^{-/-} egerek azonos oldali tibiotarzális ízületeiben, a TRPV1 receptor hiánya tehát nem befolyásolta e citokinek mennyiségét (II/21. ábra).

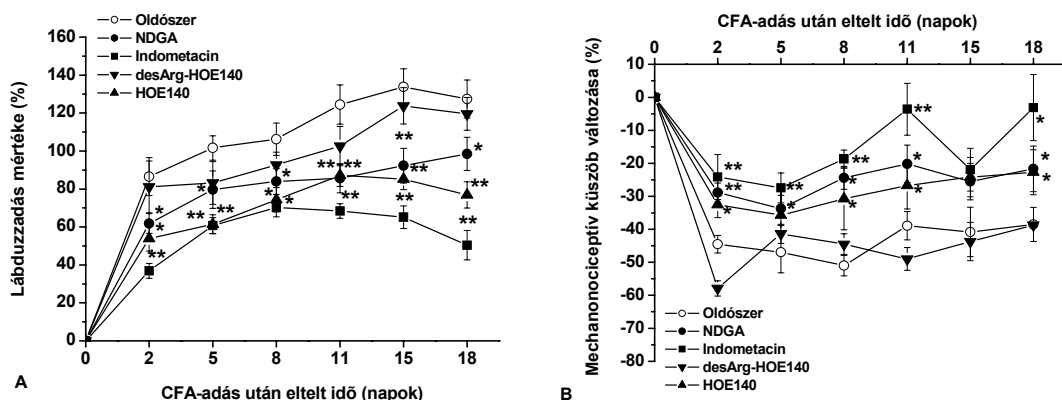


II/21. ábra. (A) IL-1 β és (B) TNF- α koncentrációi CFA-val kezelt TRPV1^{+/+} és TRPV1^{-/-} egerek tibiotarzális ízületi homogenizátumaiban (átlag±SEM; **p<0.01 vs. WT).

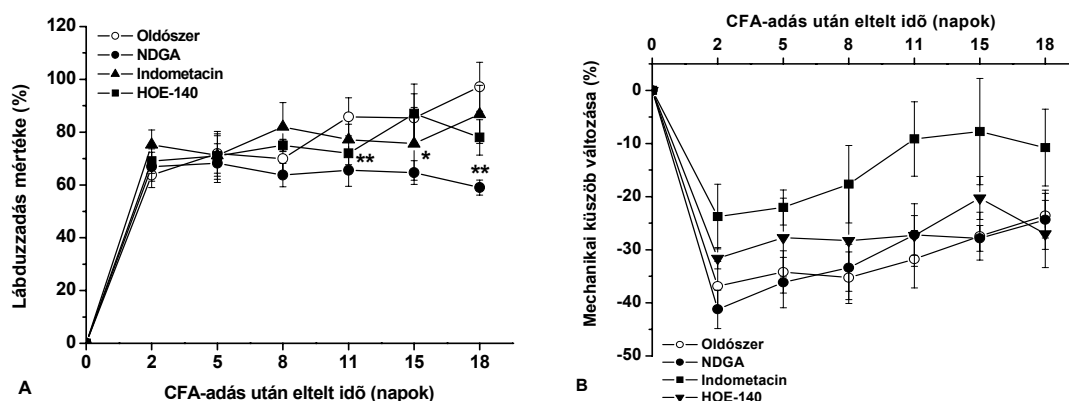
A desArgHOE-140, HOE-140, az NDGA és az indometacin hatása a CFA-val kiváltott lábduzzadásra, hiperalgéziára és szöveti elváltozásokra WT és TRPV1^{-/-}egerekben

WT egerekben a bradikinin B₁ receptor antagonistája desArgHOE-140 nem volt szignifikáns hatással sem a CFA-indukált ödémára, sem a mechanikai hiperalgéziára, és nem befolyásolta jelentős mértékben az összetett artritisz pontszámot sem. A bradikinin B₂ receptor antagonistája

HOE-140 ezzel szemben 30-40%-os gátlást okozott az ödémában és a hiperalgégiában is a teljes kísérleti periódus alatt, a szövettani összpontszámot pedig 55%-kal csökkentette. A nem-szelektív lipoxigenáz gátló NDGA 40-50%-os, míg a ciklooxygenáz-gátló indometacin 60-80%-os gátlást okozott a gyulladásos hiperalgégiában. Az ödémát az NDGA 25-30%-kal, az indometacin 40-55%-kal csökkentette, az artritisz pontszámot mindkét anyag szignifikánsan, 40%-kal és 65%-kal gátolta (**II/22. A.,B. ábra**). A TRPV1^{-/-} csoportban az NDGA és a HOE-140 nem befolyásolta egyik gyulladásos tünetet sem. Az indometacin viszont itt is 50-60%-kal csökkentette a hiperalgéziát, 20-30%-kal az ödémát és 40%-kal az artritisz pontszámot. A WT állatokkal ellentétben az indometacin a TRPV1^{-/-} egereknél nem csökkentette az ödémát a kezelés kezdeti szakaszában, az első jelentős gátlás a CFA-adást követő 11. napon volt megfigyelhető. Később mind az duzzadásgátló, mind az antihiperalgetikus hatások kisebbek voltak, mint a vad típusú csoportban (**II/23. A.,B. ábra**).



II/22. ábra. Lipoxigenáz- és ciklooxygenáz-gátló vegyületek, valamint B₁ és B₂ receptor antagonisták hatása a CFA-val kiváltott (A) lábduzzadásra és (B) hiperalgégiára WT egerekben (átlag±SEM; *p<0.05, **p<0.01 vs. WT csoport).



II/23. ábra. Lipoxigenáz- és ciklooxygenáz-gátló vegyületek és B₂ receptor antagonista hatása a CFA-val kiváltott (A) lábduzzadásra és (B) hiperalgégiára TRPV1^{-/-} egerekben (átlag±SEM; *p<0.05, **p<0.01 vs. WT csoport).

II. 5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Krónikus artritisz patkánymodelljében közvetlen bizonyítékot szolgáltatunk, hogy a kapszaicin-érzékeny primér szenzoros neuronok gyulladásos stimulusokkal aktiválódó perifériás végződéseiből szomatosztatin szabadul fel és a szisztémás keringésbe jut. Heteken keresztül kimutatható a plazmában a többszörösére emelkedett szomatosztatin koncentráció, amely a kapszaicin-érzékeny afferensek RTX-előkezeléssel történő inaktivációja után nagymértékben csökken. A fennmaradó szignifikáns 43%-os emelkedés nem-neurális eredetű, valószínűleg az immunsejtekből, szinoviális sejtekből és/vagy az épen maradt szenzoros rostokból történő felszabadulásnak köszönhető. Krónikus artritiszben valószínűleg a különböző gyulladásokeltő mediátorok aktiválják az ízületek kapszaicin-érzékeny afferensein lévő receptorokat, ioncsatornákat. Ennek következtében SOM szabadul fel, mely a keringésbe jutva szisztémás gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatást fejt ki. Annak ellenére, hogy a magas plazma SOM koncentráció a CFA-injekciót követő 30. napra jelentősen csökkent, a lábduzzadás és a hiperalgécia nem fokozódott, hanem a 21. nap után inkább csökkent (ezeket az adatokat 21 napnál tovább nem mutattam). Ez alatt az idő alatt a neuropeptideket kibocsátó szenzoros idegvégződések valószínűleg a gyulladás citotoxikus hatásának következtében károsodtak. A felszabaduló SOM funkcionális jelentőségét, azaz szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív hatását igazolja, hogy a nem-szelektív sst receptor antagonistá C-SOM-kezelés a krónikus artritisz tüneteit az RTX-előkezeléshez hasonlóan súlyosbítja. Ezen eredményeink krónikus ízületi gyulladásban is bizonyítják tehát a kapszaicin-érzékeny afferensek protektív szerepét és a neurális eredetű SOM által közvetített endogén ellenregulációs mechanizmust, amely hasonló az előző témakörben bemutatott légúti gyulladásmodellben tapasztaltnak.

A SP és a CGRP jelenlétét a bokaízületben és a szinoviális folyadékban irodalmi adatok igazolják (Kar et al. 1990). Gyulladás hatására e peptidek felszaporodnak az ízületben és a megfelelő hátsó gyöki ganglionban is (Donaldson et al. 1992; Ahmed et al. 1995a,b). A legtöbb SP és CGRP a hátsó gyöki ganglionok B-típusú kis neuronjaiból eredő, vékonyan mielinizált A δ - és mielinhüvely nélküli C-típusú rostjaiból származik (Gamse et al. 1981). Már egy régebbi közleményben Ahmed és munkatársai beszámoltak arról, hogy bár a tibiotarzális ízület kémiai vagy sebészi denervációja után a CFA-val kiváltott SP- és CGRP-emelkedés elmarad, ez nem csökkenti az ízületi gyulladás intenzitását (Ahmed et al. 1995c). A szomatosztatint ugyancsak kimutatták a térdízület kapszaicin-érzékeny afferenseiben (Elhassan et al. 1998), valamint ízületi koncentrációjának emelkedését is leírták artritiszben

(Elhassan et al. 2001). Amikor RTX-előkezeléssel a teljes szenzoros idegvégződést inaktiváljuk, akkor nyilvánvalóan nemcsak a SOM szisztémás felszabadulásának kiesésével kell számolnunk, hanem a lokálisan kiáramló gyulladások neuropeptidekével is. Bár krónikus artritiszben mind az antiinflammatorikus SOM, mind a proinflammatorikus SP és CGRP szerepet játszanak, eredményeink alapján azonban a szomatosztatinnak van nagyobb jelentősége. Számos akut neurogén gyulladást modellhező kísérletünkhöz (Szolcsányi et al. 1998a,b; Pintér et al. 2006) és az előző témakörben bemutatott légúti gyulladásokhoz (Helyes et al. 2007) hasonlóan krónikus ízületi gyulladásban is igazoltuk, hogy a kapszaicin-érzékeny afferensekből SOM szabadul fel és a keringésbe jutva gátló hatásokat fejt ki. Gyulladáscsökkentő hatásait valószínűleg (a) az afferens idegvégződésekből történő gyulladások neuropeptidek felszabadulásának gátlásán (Helyes et al. 2001), (b) közvetlenül az érfali endothelsejteken a vazodilatáció és a plazmaprotein kiáramlás csökkentésén, valamint (c) a monocita/makrofág rendszer (Krantic 2000), a B- és T-limfociták proliferációjának, citokin és immunglobulin termelésének (Kolasinski et al. 1992) gátlásán keresztül fejt ki. A SOM antihiperalgikus hatásában szerepet játszhat még az is, hogy gyulladásos körülmények között közvetlenül is gátolja a nociceptorok aktivációját és szenzitizációját (Heppelmann és Pawlak 1997; Carlton et al. 2001a).

Szomatosztatin kötőhelyet kimutattak az ízületben lévő szinoviális sejteken, limfocitákon és a szenzoros idegvégződéseken is (Carlton et al. 2003). Az sst receptorok autoradiográfiás vizsgálata igazolta e kötőhelyek felszaporodását reumatoid artritiszben és más immunológiai betegségekben (ten Bokum et al. 1999, 2000), mindössze egy receptor altípusra vonatkozó adat áll azonban rendelkezésre. Az sst₃ és sst₄ receptorok számának jelentős növekedését találták az immunsejteken adjuváns artritiszes patkányokban (ten Bokum et al. 1999). Eredményeinkkel összhangban más munkacsoportok is azt találták, hogy a szisztémás vagy intraartikuláris SOM-injekció az ízületi gyulladás azonnali mérséklődéséhez vezet mind a CFA-val kiváltott kísérletes artritiszben (Matucci-Cerinic et al. 1995; Corsi et al. 1997), mind reumatoid artritiszben szenvedő betegek esetén (Fioravanti et al. 1995). Mindezek alapján a SOM ígéretes lehet a krónikus artritisz kezelésében, néhány perces plazma felezési ideje és mind az öt sst receptorhoz való kötődése következtében kifejtett széles mellékhatás-spektruma miatt azonban nem lehet potenciális gyógyszerjelölt. Stabil szintetikus szomatosztatin analógok, elsősorban nem-peptid származékok, amelyek gyulladáscsökkentő és analgetikus hatásokkal rendelkeznek, azonban a hormonszekréciónak gátló mellékhatásokkal nem, új antireumatikum-csoport kifejlesztésére is lehetőséget nyújthatnak. Korábbi adataink (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002) és a tüdőben kapott eredményeink

alapján (ld. előző témakör) már a patkánykísérletekben feltételeztük, hogy a SOM gyulladásgátló és antinociceptív hatásait az ízületben is elsősorban az sst₄ receptorok aktivációja közvetíti. Szelektív sst₄ receptor antagonistá vegyület hiányában erre az elméletre közvetlen bizonyítékot génhiányos egerekkel tudtunk szolgáltatni. Bár ezek az eredményeink alátámasztják az sst₄ receptor gyulladáscsökkentő és antinociceptív szerepét krónikus artritiszben, sst₄^{-/-} egerekben a gyulladás súlyosbodásának mértéke korántsem volt akkora, mint amit a C-SOM-kezelt vagy az RTX-előkezelt patkányok esetében tapasztaltunk. Ez a különbség azzal magyarázható, hogy az ízületben más sst receptorok is részt vesznek a SOM gátló hatásainak közvetítésében. Ez annál is inkább lehetséges, mert a hormontermelő gasztrointesztinális tumorok és nyelőcsővarix-vérzés kezelésére használt sst₂/sst₃/sst₅ receptor agonista oktapeptidre, az oktreotidra, is leírtak az irodalomban gyulladásgátló hatásokat a CFA artritisz modellben, bár a dexamethasonnál gyengébb hatásúnak bizonyult (Kurnatowska és Pawlikowski 2000). Legvalószínűbb azért az sst₄ mellett az sst₁ receptor szerepe a gátló hatások közvetítésében, amit alátámaszt az is, hogy az sst₁/sst₄ receptor agonista TT-232 (Helyes et al. 2005; Pintér et al. 2006, 2009) nagyobb mértékű gyulladáscsökkentő és analgetikus hatásokat okozott, mint az sst₄-szelektív J-2156. A lábduzzadás kb. felére csökkent, a hiperalgéria pedig hipoalgéziává változott napi 2x400 µg/kg i.p. TT-232 hatására. Ezzel az analóggal kezelt állatokban a gyulladásos szövettani elváltozások is számottevően mérséklődtek, csupán kis mértékű pannuszképződés, gyulladásos sejtes infiltráció és minimális porckárosodás volt megfigyelhető, de csontszöveti pusztulás jelei egyáltalán nem mutatkoztak. A plazma SOM koncentrációjának emelkedését, melyet a krónikus gyulladás idézett elő, a TT-232-kezelés dózisfüggő módon csökkentette. Ennek magyarázata az lehet, hogy a gyulladásos folyamat exogén szomatosztatin agonistával történő gátlása csökkenti a szenzoros idegvégződések aktivációját, így az endogén ellenregulációs mechanizmus gyengülését eredményezi. A J-2156 egérben nagyon alacsony dózisban, 1 µg/kg-ban, szignifikánsan gátolta a duzzadást, hiperalgériát és a gyulladásos szövettani károsodást, a maximális hatás azonban kisebb volt, mint a TT-232 esetében, mindössze 25-30%.

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekre lokalizálódó TRPV1 receptor hiánya a teljes idegvégződés inaktiválásával ellentétben nem fokozta, hanem meglepő módon jelentősen csökkentette a krónikus ízületi gyulladást és a következményes hiperalgériát. Ennek a látszólagos ellentmondásnak a magyarázata lehet az, hogy az ízületi afferensekből a gyulladáskeltő tachikininek és CGRP, valamint a gyulladásgátló szomatosztatin más receptorok/ioncsatornák aktivációjával szabadulnak fel. A gyulladáskeltő neuropeptidek felszabadulása valószínűleg elsősorban a TRPV1 receptor gyulladt ízületben képződő

bradikininel, prosztaglandinokkal történő szenzitizációja és lipoxigenáz termékekkel, protonokkal történő aktivációja következtében történik. E folyamatok hiánya TRPV1^{-/-} egerekben jelentősen gátolja a gyulladást és következményes hiperalgéziát. A SOM felszabadulásában ezzel szemben eredményeink alapján valószínűleg más mechanizmusok játszanak szerepet. Ezt az elképzelést alátámasztja az a tény, hogy e szenzoros neuropeptidek csak részben kolokalizáltak fordulnak elő a kapszaicin-érzékeny afferensekben, a szomatosztatin tartalmúakon lehetséges, hogy nem a TRPV1, hanem pl. TRPA1, bradikinin receptorok, purinoceptorok stb. expressziója dominál.

Annak ellenére, hogy a TRPV1 aktiváció nem befolyásolta a TNF- α és az IL-1 β ízületi koncentrációját és az sst₄ hiányában is csak a TNF- α mennyiség emelkedett, a gyulladás funkcionális és morfológiai paramétereiben jelentős különbségeket találtunk. Ez arra utal, hogy bár e citokinek bizonyítottan fontosak a CFA-val kiváltott kísérletes artritisz (Dingle et al. 1987) és az emberi reumatoid artritisz (Farahat et al. 1993) kialakulásában, ezekről független mechanizmusok is jelentősen befolyásolják a krónikus ízületi gyulladás és a következményes hiperalgézia intenzitását.

A krónikus artritisz kialakulásában jelentős szerepet játszó neurogén gyulladásos komponenst egyetlen jelenleg forgalomban lévő gyógyszercsoport sem tudja megbízhatóan és hatékonyan gátolni. Régóta folynak vizsgálatok az ismert nem-szteroid gyulladásgátlókkal, sőt az újabb szelektív ciklooxygenáz-2 gátlókkal (pl. coxibok) kapcsolatban, amelyek a kezdeti elvárások ellenére nem hoztak terápiás áttörést. A szteroidok csak olyan nagy dózisban képesek gátló hatást kifejteni a neurogén gyulladásos folyamatokra, amelyben a számos mellékhatás veszélye miatt nem lehet tartós alkalmazásukkal számolni. Az utóbbi években a reumatoid artritisz kezelésében a gyulladás sejtes komponenseire ható erőlyes immunszuppresszív és citosztatikus hatású szerek, valamint a biológiai terápiás lehetőségek (TNF- α ellenes monoklonális antitest, szolubilis receptor) is bekerültek kezelési lehetőségek közé, a súlyos mellékhatások és toxicitás azonban alkalmazásuknak jelentős korlátokat jelent (Bingham 2008). Rendkívül nagy szükség van ezért új mechanizmussal ható gyulladásgátló/fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésére, melyek lokálisan és/vagy szisztémásan is alkalmazhatók. Eredményeink alapján két célmolekulát is azonosítottunk, a TRPV1 ioncsatornát, valamint a szomatosztatin sst₄/sst₁ receptort, amelyeken ható szelektív antagonisták, illetve agonista vegyületek új perspektívákat jelenthetnek a krónikus ízületi gyulladás farmakoterápiájában.

II. 6. A TÉMAKÖRBEN BEMUTATOTT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Elsőként bizonyítottuk, hogy a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések -a légutakban leírtakhoz hasonlóan- krónikus ízületi gyulladásban is protektív szerepet játszanak a belőlük felszabaduló és keringésbe jutó szomatosztatin közvetítésével.
2. Sst₄ receptor génhiányos egerek segítségével igazoltuk, hogy e receptor altípusnak szerepe van a szomatosztatin gyulladásgátló és antinociceptív/antiallodiniás hatásainak közvetítésében elsősorban a krónikus artritisz kezdeti szakaszában, azonban az ízületekben más szomatosztatin receptorok (pl. sst₁) aktivációja is részt vesz a gátló mechanizmusban.
3. Szintetikus, stabil sst₄/sst₁ receptor agonisták, mint a heptapeptid TT-232 és a peptidomimetikum J-2156 hatékonyan gátolják a krónikus ízületi gyulladást és a gyulladásos mechanikai allodiniát/hiperalgéziát, ezért ígéretes új perspektívát jelenthetnek gyógyszerfejlesztési szempontból is.
4. Bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy a kapszaicin-érzékeny afferenseken expresszáldó TRPV1 ioncsatorna elősorban bradikininnel és prosztaglandinokkal történő szenzitizációja és lipoxigenáz-termékekkel történő aktivációja következményeképpen -az idegvégződés egészével ellentétben- fokozza a krónikus ízületi gyulladást és allodiniát. Ennek alapján szelektív TRPV1 receptor antagonisták ugyancsak hatékony, új farmakoterápiás lehetőséget nyújthatnak artritisz kezelésére.

III. TÉMAKÖR

A KAPSAICIN-ÉRZÉKENY IDEGVÉGZŐDÉSEK, A TRPV1 ÉS SST₄ RECEPTOROK, VALAMINT A PACAP-38 SZEREPE A NOCICEPCIÓBAN ÉS ANTINOCICEPCIÓBAN

III. 1. ELŐZMÉNYEK

Nocicepció, hiperalgéria, allodinia, fájdalom

A Nemzetközi Fájdalom Társaság meghatározása szerint a nociceptív fájdalom olyan pszichofiziológiai jelenség, szubjektív érzéskvalitás, amelynek két jól definiálható komponense különíthető el. Neurobiológiai eleme a nocicepció (a fájdalmas stimulus percepciója, szenzoros tapasztalat), ami állatkísérletesen is vizsgálható, míg az affektív komponens (a fájdalom emocionális megélése) megítélésére csak emberi vizsgálatok alkalmasak. A különféle állatkísérletes modellekben vizsgálható nocicepció mechanikai (érintési), termális (hővel kiváltott) vagy kémiai (kapszaicin, formalin, ecetsav, stb.) ingerek hatására keletkezik. Az interoceptív területekről (zsigerekből, savós hárttyákból) eredő viszczerális fájdalom vizsgálatára alkalmas egérben az ecetsavval, magnézium-szulfáttal vagy fenilkinonnal kiváltott vonaglási teszt. Az exteroceptív régiókból (bőr, izom) származó szomatikus fájdalom például egérben és patkányban is a formalin teszttel vizsgálható. Az alapvetően nem fájdalmas stimulus hatására kialakuló érzékenység-fokozódást allodiniának, míg az enyhe fájdalmat kiváltó inger hatására fokozódó fájdalomérzetet hiperalgériának nevezzük. Mechanikai vagy termális allodinia és hiperalgéria is jelentkezhet gyulladás vagy különféle eredetű (traumás, toxikus) centrális/perifériás idegi sérülés következtében, amely a szomatoszenzoros, illetve a spino-talamo-kortikális pályarendszer bármely szintjén kialakulhat (Tajti és Vécsei 2006). A perifériás idegsérülésből, illetve működéscsökkenésből adódó traumás neuropátiás fájdalom kísérletesen a n. ischiadicus részleges szoros lekötésével (Seltzer et al. 1990), az egész ideg laza lekötésével (Bennett 1993) vagy az L5 gerincvelői ideg lekötésével (Kim és Chung 1992) modellezhető. Új fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésének preklinikai fázisában a vegyületek hatásának, hatásosságának meghatározása tehát nem könnyű feladat, mivel kizárólag a nocicepció vizsgálata lehetséges a nemzetközi irodalomban elfogadott állatmodellekben és vizsgálati módszerekkel. Számos neuropátiás fájdalom

egyetlen forgalomban lévő gyógyszercsoporttal (antiepileptikumok, opiátok, antidepresszánsok, lidokain) sem kezelhető kielégítő módon. Neuropátiás fájdalomra a több száz éve széles körben használt ciklooxygenáz-gátlók egyáltalán nem hatnak, az opioidok, amelyek áttörést jelentettek a tumoros fájdalom csillapításában, csekély terápiás hatékonysággal rendelkeznek. Nagy szükség van ezért alapvetően új hatásmechanizmusú, elsősorban közvetlenül az érzőideg-végződéseken ható fájdalomcsillapítók kifejlesztésére is. Ennek érdekében az utóbbi évtizedben számos nocicepció modellt állítottunk be és vizsgálati módszerek széles skáláját sajátítottuk el.

A kapszaicin-érzékeny idegvégződések és a TRPV1 ioncsatorna szerepe a nocicepcióban

Évezredes tapasztalatok alapján számos olyan gyógymódot használnak mind a hagyományos, népi, mind a modern orvoslásban, ami lokális bőrizgatáson keresztül fejt ki fájdalom- és gyulladáscsökkentő hatást (pl. kapszaicines vagy kámforos oldat bedörzsölése, mustártapasz). Ezeket az eljárásokat „ellenirritációnak” is nevezik, arra utalva, hogy az elsődlegesen irritációt kiváltó beavatkozás ellentétes, a gyulladásos tüneteket enyhítő hatáshoz vezet. A felületi, lokális szövetizgatás mélyebb rétegekre, illetve a szervezet egészére kifejtett hatásának pontos mechanizmusa azonban kevésbé vált ismertté, hatékonyságukat elsősorban a keringés fokozódásával vagy reflexes folyamatokkal magyarázták. A polimodális nociceptorok működésének vizsgálata során azonban olyan meglepő eredmények születtek, amelyek újszerű magyarázatot kínálnak a látszólag paradox „ellenirritáció” jelenségére. A lokális neurogén gyulladás kialakulásával párhuzamosan felszabadul(nak) a szisztémás keringésbe kerülő gátló hatású mediátor(ok) is. Ezek közül a szomatosztatin gyulladásgátló szerepére vonatkozóan számos kísérletes bizonyítékot mutattam be az előző két témakörben. A jelenség szervezetben betöltött szerepének szempontjából érdekes az a korábbi, még PhD munkám alatt tett megfigyelés, hogy a szomatosztatin-felszabadulás és a gátló hatás már az igen alacsony, 0.1 Hz frekvenciával történő stimuláció következtében is kialakul, ami még sem fájdalmat, sem neurogén gyulladást nem vált ki (Szolcsányi 1996 a,b; Szolcsányi et al. 1998a). Ezek az adatok is a kapszaicin-érzékeny neuronok élettani szerepének komplexitására utalnak. Bár a jelenség leírása a mi kutatócsoportunk munkájához fűződik, az sst receptor antagonistá C-SOM felhasználásával egy másik munkacsoport is bizonyítékokat szolgáltatott a neuronális eredetű endogén szomatosztatin szisztémás antinociceptív hatásaira. Ők igazolták, hogy a szomatosztatin tónusos gátló hatást fejt ki a formalinnal kiváltott fájdalomreakcióra (Carlton et al. 2001b), valamint hogy ez a neuropeptid lehet a kapszaicines „ellenirritációval” kiváltott antinocicepció mediátora (Carlton et al. 2003).

A TRPV1 receptor klónozása után nyert igazolást, hogy a receptort a fájdalmas hőingerek és az alacsony pH közvetlenül képesek aktiválni, valamint központi szerepe van a nociceptort érő fájdalmas stimulusok integrálásában is (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998). A TRPV1 receptor génhiányos egereken végzett első kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a TRPV1 receptor hiányában az állatok hőküszöbe nem különbözött a vad típusú egerekétől (Davis et al. 2000; Caterina et al. 2000). Ez az adat meglepő volt annak ismeretében, hogy a kapszaicinnal deszenzibilizált állatok fájdalmas hőérzete csökken (Szolcsányi 1985, 1987). Ez a különbség is azt mutatja, hogy a teljes idegvégződés és az azon lokalizálódó TRPV1 receptor szerepe sokféle patofiziológiai folyamatban eltérő, ezt bizonyították az előző témakörben bemutatott, krónikus ízületi gyulladásmodellben nyert eredményeink is. Gyulladásos termális hiperalgécia azonban nem alakult ki TRPV1 génhiányos egerekben, ami arra utal, hogy a nociceptorok hőszenszibilizációja e receptor közvetítésével jön létre (Davis et al. 2000; Caterina et al. 2000). A TRPV1 kemonocicepcióban, mechanonocicepcióban és krónikus neuropátiás állapotokban betöltött szerepéről nem volt azonban irodalmi adat. Gyulladásmodellekben nyert eredményeink azt mutatták, hogy ennek a nem-szelektív ligandfüggő kationcsatornának a szerepe nagyon különböző lehet a patofiziológiai folyamat mechanizmusától, illetve a TRPV1 receptor aktivációjával felszabaduló szenzoros neuropeptidek jelentőségétől függően.

A szomatosztatin szerepe a nocicepcióban

A szomatosztatin központi idegrendszeri mechanizmussal kialakuló gátló hatásaira vonatkozóan számos adat áll rendelkezésre. Intratekális, epidurális, intracerebroventrikuláris alkalmazás után a natív SOM és az oktreotid is hatékonyan gátolta a posztoperatív fájdalmat (Chrubasik et al. 1984, 1985; Taura et al. 1994), csontfájdalmat (Burgess et al. 1996), a tumoros fájdalmat (Chrubasik et al. 1984; Meynadier et al. 1985), ízületi gyulladással járó fájdalmat (Matucci-Cerinic és Marabini 1998; Silveri et al. 1994), a vizszerális fájdalmat (Plourde et al. 1993) és a migrént (Kapicioglu et al. 1997). Hangsúlyozandó azonban, hogy a nagy dózisé, központi idegrendszerbe történő ismételt SOM-injekció toxikus hatást fejtett ki a mellő és hátsó szarv neuronokra a gerincvelőben és fokális demielinizációt okozott (Gaumann et al. 1989; Mollenholt et al. 1988), amelyért elsősorban a vazokonstriktor hatást tették felelőssé (Freedman et al. 1988). E problémának a kiküszöbölése periférián ható sst agonistákkal lehetséges. Ez annál is inkább érdekes, mert több évtizede leírták, hogy szisztémásan, sőt lokálisan alkalmazott SOM is analgetikus hatásokkal rendelkezik (Lembeck et al. 1982; Chrubasik 1991; Fioravanti et al. 1995; Matucci-Cerinic et al. 1995; Corsi et al.

1997). Patkányízületbe injektált sst agonisták csökkentették a rotáció hatására létrejövő afferens aktivitást (Heppelmann és Pawlak 1997), emberi ízületbe adott szomatosztatin pedig gátolta a gyulladásos fájdalmat (Matucci-Cerinic és Marabini 1998; Silveri et al. 1994).

Egy csaknem tíz évvel ezelőtt végzett kísérletsorozatunkban azt találtuk, hogy altatott patkányokban a n. ischiadicus kapszaicin-érzékeny afferenseinek antidrómos elektromos ingerlésének hatására az intraarteriális kapszaicinnal kiváltott nocifenzív vegetatív reflexválaszok csökkennek. Hasonló gátlást tapasztaltunk szomatosztatin, illetve szintetikus SRIF2 (sst₁/sst₄) receptor agonisták i.v. injekciója után, a SRIF1-szelektív agonista oktapeptid oktreotid azonban hatástalan volt (Helyes et al. 2000). Mivel légúti és ízületi gyulladásban bizonyítottuk a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekől a szisztémás keringésbe kerülő szomatosztatin felszabadulását és ennek gátló hatásait (Helyes et al. 2004, 2007), krónikus fájdalommodellekben is felmerült a szomatosztatin antinociceptív hatásainak vizsgálata.

A PACAP nocicepcióban betöltött szerepére vonatkozó eddigi eredmények

Mivel a PACAP-38 jelenlétét a fájdalomközvetítő pályarendszer több szintjén, pl. a gerincvelő hátsó szarvában (Dickinson és Fleetwood-Walker 1999; Dickinson et al. 1999), a hátsó gyöki ganglionokban (Moller et al. 1993; Mulder et al. 1994) és a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok perifériás végződéseiben (Zhang et al. 1996; Fahrenkrug és Hannibal 1998; Uddmann et al. 1998) is bizonyították, feltételezhető volt, hogy a PACAP részt vesz a nociceptív folyamatokban. Ezt az elképzelést azonban rendkívül kevés funkcionális adat támasztotta alá, az összes erre irányuló *in vivo* kísérletben kizárólag a PACAP központi idegrendszeri hatásait vizsgálták és meglehetősen ellentmondásos eredményekre jutottak (Shimizu et al. 2004). Az intratekálisan adott PACAP gátolta a nociceptív reflexműködést és a gyulladás következtében kialakuló nocicepciót (Yamamoto és Tatsuno 1995; Zhang et al. 1996; Onou et al. 2007). Intracerebroventrikulárisan adva a PACAP a formalin teszt korai fázisában analgetikus hatásúnak, míg a késői fázisban pronociceptívnek bizonyult (Shimizu et al. 2004). Másrészt azonban a központi idegrendszerbe adott PACAP dózisfüggő módon csökkentette a hőküszöböt a talpban, és szerepet játszott a nociceptív stimulus hátsó szarvba történő közvetítésében, elsősorban N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon keresztül (Ohsawa et al. 2002). PACAP hiányos egerekben sem termális, sem mechanikai hiperalgécia nem jött létre carrageninnel kiváltott gyulladás, illetve gerincvelői idegátmetszés után (Mabuchi et al. 2004). A PACAP-38 nociceptív folyamatokban betöltött szerepének megítélése tehát korántsem volt egyértelmű, különösképpen, mert perifériás hatásaira vonatkozóan egyáltalán nem állt rendelkezésre adat.

A fájdalomcsillapítás nem-farmakológiai megközelítése

Számos korábbi eredmény igazolta a sztatikus mágneses tér (static magnetic field, SMF) hatásait különböző viselkedésmintázatokban és idegi működésekben (Nolte et al. 1998; Houpt et al. 2003). Az SMF nociceptív folyamatokra gyakorolt hatásáról szóló kísérletek eredményei meglehetősen ellentmondásosak. Néhányan arról számoltak be, hogy rövid időre mágneses térbe helyezett egerekben csökken a morfin- és stressz-indukálta analgézia (Kavaliers et al. 1984; Choleris et al. 2002) és nő a fájdalmas hőre való érzékenység (Del Seppia et al. 2003). Mások ettől eltérően azt találták, hogy az SMF-nek nincs hatása a fájdalomra emberben (Hong és Shellock 1990; Reeser et al. 2005). Arra is van azonban több adat, hogy az SMF antinociceptív hatásokkal rendelkezik különböző egérmodellekben (Shupak et al. 2004; Prato et al. 2005). Az ellentmondó eredmények magyarázata lehet, hogy a kísérleteket különböző fajokon végezték, valamint hogy a kiváltott hatás függhet a mágneses tér eltérő tulajdonságaitól, másképpen beállított paramétereitől és a behatás időtartamától is.

Az általunk használt sztatikus mágneses mezőt létrehozó készüléket dr. László János (MTA Matematikai Tudományok Osztálya) készítette, optimalizálása és validálása egér vonaglási tesztben történt (László et al. 2007). A készülékben alul és felül elhelyezkedő mátrixok 5 mm sugarú, 10 mm magasságú, hengeralakú neodímium-vas-bór (NdFeB) összetételű mágneseket tartalmaznak. Az egyedi mágnesek jellemző értékei az 1.47 T értékű remanens mágneses indukció, a 373-406 kJ/m³ tárolt energiasűrűség és a 80°C maximális működési hőmérséklet. Minden mágnes a szomszédjaival ellentétes polaritású, a másik mátrixban vele szemben elhelyezkedő mágnessel megegyező tengelyű és irányú. Erre a mágneses térre a továbbiakban az optimalizált sztatikus mágneses tér (oSMF) elnevezést használjuk (László et al. 2007).

A pontos mechanizmus, amellyel a SMF változatos hatásait kiváltja, egyelőre ismeretlen (Lockwood et al. 2003; Saunders 2005), bár néhány adat utal az endogén opioid rendszer és egyes ioncsatornák vezetőképességének megváltoztatására (Rosen 1996, 2003). Számos eredmény alapján feltételezhető, hogy a gyenge SMF csökkenti az ideg ingerületvezetésének sebességét a Ca²⁺- és Na⁺-csatornák működésének gátlásán keresztül (Rosen 1996; Wieraszko 2000; Rosen 2003), ezért merült fel bennünk annak a lehetősége, hogy esetleg kapcsolat lehet a SMF hatásmechanizmusa és a kapszaicin-érzékeny idegvégződések között.

III. 2. CÉLKITŰZÉSEK

Ebben a témakörben bemutatott kísérletsorozatokban olyan ígéretes célmolekulákat szeretnénk azonosítani, amelyek reményeink szerint alapvetően új mechanizmussal ható fájdalomcsillapító gyógyszerek kifejlesztésére nyújthatnak lehetőséget. Elsősorban a TRPV1 receptor szerepét és a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló peptid mediátorok antinociceptív hatásait, ezek mechanizmusát és receptoriális hátterét, valamint a rostok fizikai úton történő aktiválhatóságát szeretném ismertetni állatkísérletes modellekben, négy konkrét kérdésfelvetés kapcsán.

1. Az előző két témakörben bemutattam, hogy gyulladásos folyamatokban a TRPV1 receptornak mind pro- mind antiinflammatorikus szerep tulajdonítható a patomechanizmustól és ezen ioncsatorna aktivációjával felszabaduló neuropeptidek jelentőségétől függően. E témakör első részében a TRPV1 receptor szerepét vizsgáltuk akut és krónikus nocicepció modellekben génhiányos egerek segítségével.

2. Célunk volt a számos gyulladásmodellben már vizsgált és az előző témakörökben bemutatott szintetikus szomatosztatin receptor agonisták, az sst₁/sst₄ agonista heptapeptid TT-232 és az sst₄-szelektív peptidomimetikum J-2156 hatásainak vizsgálata patkány és egér fájdalommodellekben.

3. A PACAP-38 kimutatható a kapszaicinre érzékeny szenzoros neuronokban, de a nocicepcióban betöltött szerepére vonatkozóan a rendelkezésre álló ellentmondásos irodalmi adatok kizárólag a központi idegrendszerre fókuszálnak. Ebből kiindulva jelen kísérleteinkben a PACAP-38 perifériás hatásait vizsgáltuk különféle nocicepció modellekben.

4. A fájdalomcsillapító hatás kiváltása céljából tapasztalati alapon régóta alkalmazott mágneses térre vonatkozó irodalmi adatok alapján érdekesnek látszott megvizsgálni, hogy egy ilyen fizikai behatás állatkísérletesen is képes-e antinociceptív hatást kiváltani. Több modellben megvizsgáltuk ezért, hogy miként befolyásolja egy optimalizált paraméterekkel rendelkező sztatikus mágneses tér a nocifenzív viselkedést és a gyulladásos hiperalgéziát. Arra is szerettünk volna választ kapni, hogy a jelenségben lehet-e potenciális szerepe a kapszaicin-érzékeny peptiderg idegvégződéseknek.

III. 3. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Állatok

Kísérleteinket C57Bl/6 WT és TRPV1^{-/-}, Balb/c, CD1 és CFLP egereken, valamint Wistar patkányokon végeztük, amelyek tenyésztésére, tartására és a kísérletek etikai hátterére vonatkozó adatokat az előzőekben ismerttettem. Minden kísérleti eljárás megfelel a fájdalom vizsgálatára létrehozott nemzetközi tanács javaslatainak (Zimmermann 1983) és az állatkísérletek végzéséről szóló 243/1998. sz. kormányrendelet előírásainak.

II. 3. 1. Akut nocicepció tesztek:

a.) Forbolészterrel kiváltott akut kemonocicepció vizsgálata

A protein kináz C (PKC) aktivátor forbolészter, forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA, 10 µg/ml, 20 µl) i.pl. injekciójával váltottunk ki akut nocifenzív reakciót C57Bl/6 és TRPV1^{-/-} egerekben. A kvantitatív értékeléshez a lábnyalással és lábemeléssel eltöltött időt vizsgáltuk a beadást követő 45 percen keresztül (Watson et al. 1997).

b.) Formalinnal kiváltott akut szomatikus kemonocifenzív viselkedés vizsgálata

Formalin i.pl. adása jellegzetes lefolyású nocifenzív magatartást vált ki, amely egy akut (0-5 perc) és egy késői fázisból áll (20-45 perc). A korai fázis a nociceptorok közvetlen aktiválásából ered, míg a késői komponens a fokozatosan kialakuló gyulladás következménye (Dubuisson és Dennis 1977; Tjolsen et al. 1992). Az állatok egyik hátsó talpába 2.5%-os (egereknek 50 µl, patkányoknak 100 µl) formalint injektáltunk, egerek szinte csak talpnyalogatással, patkányok lábemelésekkel (rázások) és nyalásokkal egyaránt jellemezhető reakciót mutatnak. Egereknél ezért a talpnyalogatással eltöltött időt mértük, patkányoknál összetett fájdalom pontszámot számoltunk (Composite Pain Score: 2x a lábnyalások időtartama + 1x a lábemelések időtartama/ teljes időtartam; Watson et al. 1997).

A formalin-adás előtt 20 perccel Balb/c egereknek i.p. J-2156-ot (1, 10 és 100 µg/kg), patkányoknak TT-232-t (20-80 µg/kg i.p.), illetve referencia vegyületként a ciklooxygenáz gátló diclofenacot (50 és 100 mg/kg) injektáltuk. A PACAP perifériás hatásainak vizsgálatára formalin injekció előtt 5 perccel a patkányoknak i.pl. 100 µl 2 µM PACAP-38-at adtunk. A PAC₁ és VPAC receptorok szerepének vizsgálatára külön állatcsoportokban a PACAP-38 (50 µl, 4 µM) adása előtt 5 perccel tízszeres koncentrációban (50 µl, 40 µM) i.pl. PAC₁ receptor-szelektív antagonist M65-öt (Abad et al. 2006), illetve a VPAC₁/VPAC₂ receptor-antagonista VIP(6-28)-at (Somogyvári-Vígh és Reglődi 2004).

c.) Akut viszcerális kemonocicepció vizsgálata vonaglási teszttel

Irritáns anyagok (200 µl 0.6% ecetsav, 0.02% fenilkinon, 2% MgSO₄) i.p. injekciója egerekben jellegzetes „vonagló” mozgást („writhing”) eredményez, amellyel a viszcerális fájdalom modellezhető. A peritoneum irritációja a hasfal izomzatának defenzív összehúzódásához vezet, amelyet a törzs és végtagok extenziója követ. A reakció intenzitását az algogén anyag beadását követően a „writhing” mozdulatok száma alapján értékeltük (Hendershot és Forsaith 1959; Witkin et al. 1961).

A TT-232-t (5-200 µg/kg) és a PACAP-38-at (100 µg/kg) 30 perces s.c. előkezelésben alkalmaztuk, majd 20 percen keresztül számoltuk az abdominális konstriktók számát.

d.) Carrageninnel kiváltott gyulladásos mechanikai hiperalgémia/allodinia vizsgálata

Az egyik hátsó talpba 3%-os carrageenint injektáltunk (egereknek 50 µl, patkányoknak 100 µl), az ellenoldali végtagot kontrollként használtuk. A carrageenin tengeri moszatból származó poliszacharid, amely kevert típusú akut gyulladást és következményes hiperalgémia/allodiniát vált ki. A mechanonociceptív küszöbméréseket eszteziométerrel carragenin-adás előtt és 2, illetve 3 órával utána végeztük.

Egereknek i.p. 100 µg/kg J-2156-ot, patkányoknak PACAP-38-at i.pl. injektáltunk minden mérés előtt 5 perccel.

e.) Reziniferatoxinnal kiváltott mechanikai hiperalgémia

Egerek bal hátsó talpába 20 µl 0.1 µg/ml RTX-oldatot injektáltunk, a jobb talpat kontrollként használtuk. A mechanonociceptív küszöböket eszteziométerrel mértük az RTX-injekció előtt és 30 perccel utána.

f.) Enyhe hőtraumával kiváltott hő- és mechanikai hiperalgémia vizsgálata

Patkányok fájdalmas hőküszöbét kollégáim és az Experimetria Kft. által kidolgozott és validált emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük (Bölcskei et al. 2007). A vízfürdő hőmérséklete 30°C-ról indul és fokozatosan 53°C-ig emelkedik. Az állatokat lazán, de stabilan tartjuk, egyik hátsó lábukat a 30°C-os vízfürdőbe merítjük, majd elindítjuk a hőmérsékletemelést. A termonociceptív küszöböt, amelynél az állat kihúzza a lábát, a digitális kijelzőről leolvassuk. Kontroll méréseket követően az állatok egyik hátsó lábát altatásban 51°C-os vízfürdőbe mártottuk 15 másodpercre, majd ismételt méréseket végeztünk.

A 20 perces mérés után 100 µl 2 µM PACAP-38-at, illetve NaCl-t injektáltunk i.pl., a termonociceptív küszöböket 10 percenként mértük. A PAC₁ és VPAC receptorok szerepének vizsgálatára 5 perccel a PACAP-38 (50 µl, 4 µM) adása előtt egy állatcsoport 50 µl 40 µM

PAC₁ receptor-szelektív antagonistá M65-t, egy másik állatcsoport olyanekora dózisé VPAC receptorokon ható antagonistá VIP(6-28)-at kapott intraplantárisan.

III. 3. 2. Krónikus neuropátia modellek:

A neuropátias fájdalom krónikus, terápiásan nehezen befolyásolható állapotot jelent, melynek számos etiológiája lehet, pl. trauma, diabétesz vagy egyéb toxikus károsodás. Az afferens idegek sérülése hiperalgéziát tart fenn, a nociceptorok küszöbe csökken, nagyobb frekvenciájú küszöléssel reagálnak az ingerekre és spontán aktivitást is mutatnak. A számos kóreredetnek megfelelően állatkísérletben is többféle módon válthatunk ki neuropátiát.

a.) Traumás mononeuropátia modell (Seltzer-modell)

A n. ischiadicus részleges lekötése után az érintett végtagon mechanikai hiperalgégia alakul ki (Seltzer et al. 1990; Malmberg és Basbaum 1998). Az egyik n. ischiadicus 1/3-1/2 részét patkányoknál 8/0-s, egereknél 10/0-s atraumatikus varrófonallal szorosan lekötöttük. A mechanonociceptív küszöbököt egérben eszteziométerrel, patkányban analgeziméterrel mértük a műtét utáni 7. napon, amikorra az akut sebfájdalom biztosan megszűnik. A különböző mechanonocicepció mérési módszerek oka, hogy az analgeziméter egérben technikailag nem alkalmazható (túl kicsi az egérláb és túl erős a mechanikai inger). Bár patkányban az eszteziométer jól használható gyulladásmodellekben, ebben a neuropátia modellben nem megbízható, mert az ideglekötésből adódóan az állat nem mindig teszi le teljesen a talpát a rácsos lapra. Mivel patkányoknak intakt állapotban a tompa végű tűvel kifejtett mechanikai stimulus nem fájdalmas inger, a küszöbcsökkenést itt allodiniának nevezzük. Ezzel szemben egereknek az alkalmazott mechanikai stimulus enyhe fájdalominger, így ebben az esetben a küszöbcsökkenést hiperalgégiának hívjuk.

b.) Streptozotocinnal kiváltott diabéteszes polineuropátia modell

A streptozotocin (STZ) szelektíven elpusztítja a pancreas β -sejtjeit, így a kezelést követő hetekben kísérletes diabétesz mellitusz alakul ki (Courteix et al. 1993). Az állatok általános állapota is fokozatosan romlik és a szenzoros polineuropátia következtében mechanikai hiperalgégia is kialakul. Kontroll méréseket követően 50 mg/kg i.v. STZ-t adtunk, két hét múlva minden állat vércukorszintje 15 mmol/l felett volt. A mechanonociceptív küszöböt eszteziométerrel mértük hetente, a küszöbcsökkenést százalékban adtuk meg.

c.) Ciszplatinnal kiváltott toxikus polineuropátia modell

A ciszplatin-kezelés egyik jellemző mellékhatása a klinikai gyakorlatban a perifériás idegkárosodás. Ez a vegyület alkalmas kísérletes toxikus polineuropátia modellezésére is

(Authier et al. 2003). Öt héten keresztül heti háromszor végeztünk ciszplatin kezelést (2 mg/kg i.p.), a mechanonociceptív küszöböt hetente mértük eszteziométerrel.

A krónikus polineuropátia modellekben RIA módszerrel határoztuk meg a plazma szomatosztatin koncentrációját (Németh et al. 1996).

Az optimalizált sztatikus mágneses tér

A oSMF-et létrehozó készüléket egy ferromágneses anyagból készült keret, és egy abba illeszkedő 140*140*46 mm méretű műanyag ketrec alkotja, amelyben az egerek szabadon mozognak (László et al. 2007), kontrollként egy ugyanilyen ketrec szolgált a mágneses tér nélkül. Az első két kísérletsorozatban egy vizsgálat során az egereket a kísérlet előtt 5 perccel tettük az oSM-be és ott is tartottunk végig a teljes mérési periódus alatt. A hiperalgédia modellekben a gyulladás kiváltása előtt 5 perccel az állatokat az oSMF-be helyeztük és a gyulladáskeltő injekciót követően a mérésig ott tartottuk.

Rotarod teszt

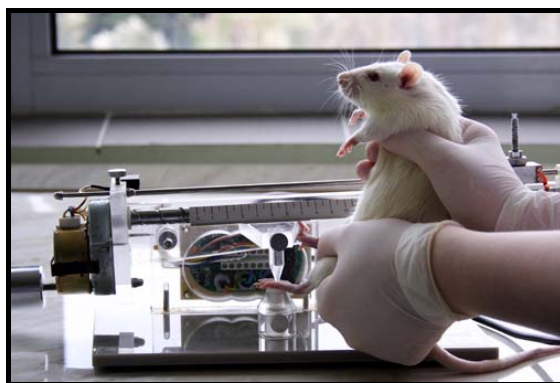
Fokozódó sebességű Rotarod (Ugo Basile 7750) készülékkel azt is megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e az oSMF-expozíció az egerek mozgáskordinációját és motoros működését (Jones és Roberts 1968). A készülék forgó dobjainak sebessége fokozatosan emelkedik 4-ről 40 fordulat/percre. Amikor az állat leesik, az eredményt másodpercben olvashatjuk le.

A kapszaicin-érzékeny afferensek inaktiválása RTX-előkezeléssel

Az oSMF hatásait vizsgáló kísérletekben Balb/c egerekben a kapszaicin-érzékeny afferensek működésének szelektív blokkolására az előző témakörökben ismertetett protokollnak megfelelően nagy dózisu RTX-előkezelést végeztünk 7-14 nappal a kísérletek előtt.

Mechanonociceptív küszöb mérése analgeziméterrel

Patkány mononeuropátia modellben a mechanikai fájdalomküszöb-csökkenés (mechanikai hiperalgédia) meghatározására legalkalmasabb módszer a Randall-Selitto teszt. A láb mechanonociceptív küszöbét Ugo Basile analgeziméterrel végeztük (Pintér et al. 2002). A lazán kézben tartott állat hátsó lábát a tompahegyű plexikúp alá helyezzük, majd a lábhatat egyenletesen fokozódó erőhatásnak tesszük ki. Az állat a fájdalomküszöb elérésekor kirántja a kúp alól a lábát, az érték grammban leolvasható a skáláról (*III/1. ábra*).



III/1. ábra. Patkányláb mechanonociceptív küszöbének mérése Ugo Basile analgeziméterrel (Randall-Selitto teszt)

A térdízület primér afferenseinek elektrofiziológiai vizsgálata

Ez a kísérletsorozat nem munkacsoportunkban, hanem egy kollaborációm keretein belül a Calgary Egyetem Élettani és Biofizikai Intézetében történt, az eredmények tehát nem saját kísérleti adataim. A PACAP-38 perifériás hatásainak komplex megértése és a helyes következtetések levonása céljából azonban fontosnak tartom e kísérlet ismertetését is. A módszer technikai részletei az eredeti közleményünkben megtalálhatók (Sándor et al. 2009). Röviden, altatott patkányok térdízületében kaolin-carragenin-injekcióval akut szinoviális gyulladást váltottak ki. A csípőízületet immobilizálták, a lábat egy standard rotációt kiváltó készülékhez kapcsolták. A n. saphenust az ízülettől disztálisan és proximálisan is átvágták, a proximális csont axonkötegeiről vezették el az aktivitásokat. Az ízület normál rotációja során 28 rostot vizsgáltak. A PACAP-38-at a saphenus artériába injektálták (0.1 ml 2 μ M).

Statisztikai értékelés

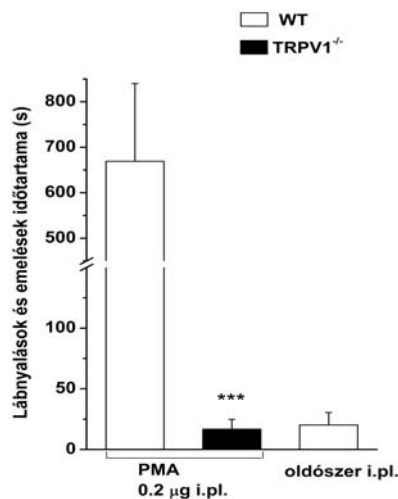
A mechanikai hiperalgéria/allodinia adatokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni vagy Dunnett-féle poszt tesztel, az elektrofiziológiai adatokat kétutas ANOVA-val, az akut nocifenzív tesztek eredményeit Student-féle páratlan t-próbával értékeltük. Minden csoportban 6-12 állat átlagát számoltuk, * $p < 0.05$ és ** $p < 0.01$.

III. 4. EREDMÉNYEK

III. 4. 1. Fejezet: A TRPV1 RECEPTOR SZEREPE AKUT ÉS KRÓNIKUS NOCICEPCIÓ MODELLEKBEN

Forboléssterrel kiváltott akut nocifenzív reakció WT és TRPV1^{-/-} egerekben

A vad típusú egerekben a PMA injekciója lábnyalásokkal és lábemelésekkel jellemezhető akut nocifenzív reakciót váltott ki a beadást követő 5-45 percen keresztül. A TRPV1^{-/-} állatokban a PMA egyáltalán nem okozott fájdalomreakciót, annak időtartama nem különbözött az oldószerrel kezelt csoportban tapasztalttól (III/2. ábra).



III/2. ábra. PMA i.pl. injekciójával kiváltott nocifenzív reakció vad típusú WT és TRPV1^{-/-} egerekben (n=9-12; átlag±SEM; ***p<0.001 vs. WT).

Formalinnal kiváltott akut szomatikus nocifenzív reakció WT és TRPV1^{-/-} egerekben

A formalin i.pl. injekciója kétfázisú nocifenzív reakciót váltott ki. Az elsőben (0-5 perc) a lábnyalások időtartama 130.7±12.6 s volt a WT egerekben és 99.7±16.1 s a TRPV1^{-/-} csoportban, míg a másodikban (20-45 perc) ezek az értékek 268.7±50.7 s és 363.6±37.8 s voltak. A két csoport eredményei tehát egyik fázisban sem különböztek szignifikánsan.

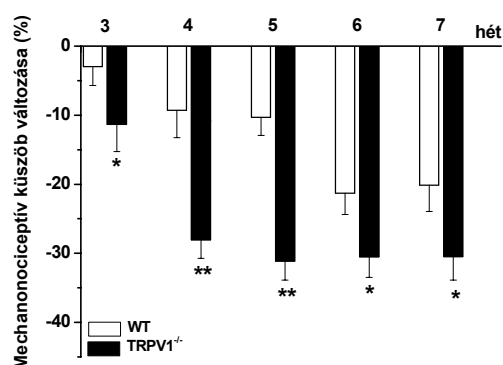
Carrageninnel kiváltott gyulladásos mechanikai hiperalgémia WT és TRPV1^{-/-} egerekben

A kontroll mechanonociceptív küszöb 7.85±0.2 g volt a vad típusú és 7.31±0.3 g a TRPV1 génhiányos egerekben. Az i.pl. carragenin-injekció hatására a láb megduzzadt és kipirosodott. A kezelés után 3 órával a mechanikai küszöb mindkét csoportban hasonló mértékben

csökkent: a WT egerekben 5.35 ± 0.3 g-ra ($31.7 \pm 4.1\%$ -os hiperalgédia), a TRPV1^{-/-} állatokban 4.9 ± 0.3 g-ra ($31.8 \pm 6.1\%$ -os hiperalgédia).

Mechanikai hiperalgédia streptozotocinnal kiváltott diabéteszes polineuropátiában

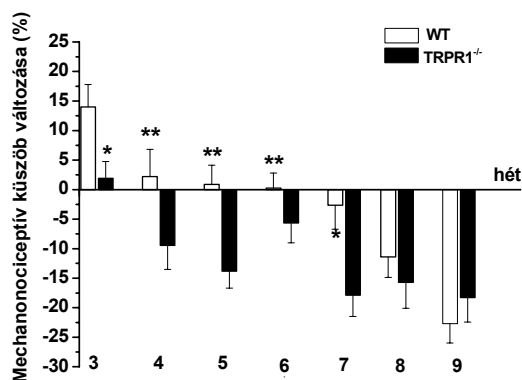
A WT egerek kontroll mechanonoczeptív küszöbe 6.7 ± 0.2 g, míg a TRPV1^{-/-} csoportban 6.9 ± 0.3 g volt. A streptozotocin-kezelés után 2 héttel minden egérben létrejött a diabétesz. A TRPV1^{-/-} egerekben a mechanikai hiperalgédia már a 3. hétre kialakult és a 7. hetes periódus alatt végig szignifikánsan súlyosabb volt a WT egerekéhez viszonyítva (III/3. ábra).



III/3. ábra: Diabéteszes neuropátiás mechanikai hiperalgédia (n=8-10; átlag \pm SEM; *p<0.05 **p<0.01 vs. WT).

Mechanikai hiperalgédia ciszplatinnal kiváltott toxikus polineuropátiában

A ciszplatinnal kezelt állatok mechanonoczeptív küszöbe a kezelés első 3 hetében nem változott a kontroll küszöbökhez képest (6.6 ± 0.2 g, mindkét csoportban). A TRPV1^{-/-} egerekben a 4. héttől alakult ki szignifikáns hiperalgédia, míg a vad típusúakban csak 4 héttel később. A 8. héttől azonban szignifikáns különbség nem volt a csoportok között (III/4. ábra).



III/4. ábra. Ciszplatinnal kiváltott toxikus neuropátiás mechanikai hiperalgédia (átlag \pm SEM, n=8-10, *p<0.05 **p<0.01 vs. WT).

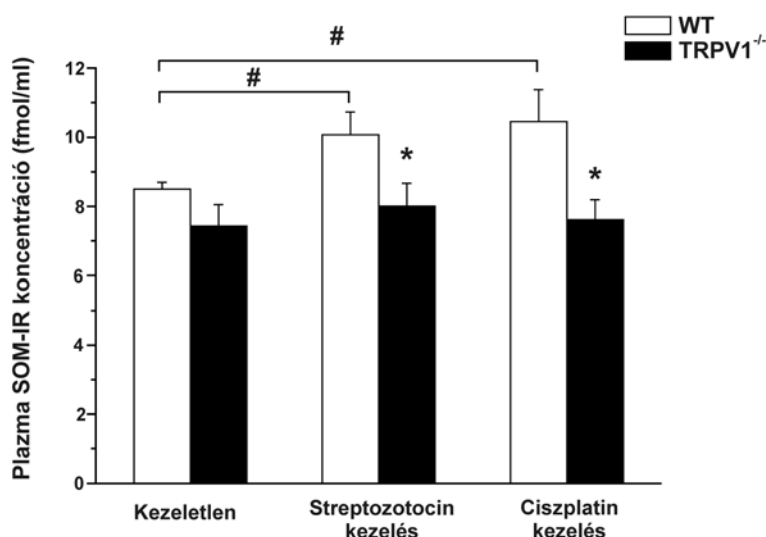
Mechanikai hiperalgéria traumás neuropátiában

A részleges n. ischiadicus léziót követő első héten az operált végtagon mechanikai hiperalgéria fejlődött ki, amely a mérési periódus 5 hetén keresztül fennmaradt. Mértéke a 2. héten volt a legnagyobb, ekkor a TRPV1^{+/+} állatokban $45.13 \pm 4.7\%$, a TRPV1^{-/-} állatokban pedig $40.53 \pm 4.0\%$ volt. Szignifikáns különbséget egyik mérés során sem találtunk a vad típusú és a TRPV1 receptor génhiányos egerek között.

Plazma szomatosztatin koncentrációk a krónikus polineuropátia modellekben

Kezeletlen állatokban a plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitása közel azonos volt a WT és a TRPV1^{-/-} csoportokban. A neuropátiás állatok plazma SOM-IR meghatározására a viselkedési vizsgálatok eredményei alapján azokat az időpontokat választottuk, amikor a legnagyobb különbséget találtuk a mechanikai hiperalgériában a vad típusú és a génhiányos egerek között, így a diabéteszes neuropátiás állatoknál a kezelést követő 5. héten, míg a ciszplatinnal kiváltott neuropátiában a 7. héten történt a vérminták levétele.

A neuropátiás WT egerek plazma szomatosztatin szintje szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen kontroll csoporthoz képest mind a diabéteszes, mind a ciszplatinnal kezelt állatokban. Ezzel szemben a TRPV1^{-/-} egerekben nem jött létre SOM-IR emelkedés, a plazmakoncentrációk változatlanok maradtak (III/5. ábra).

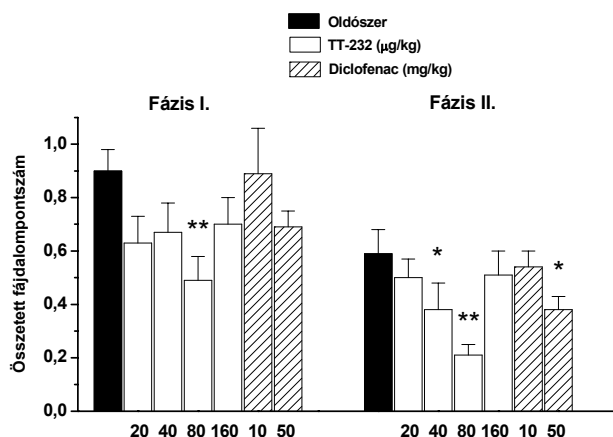


III/5. ábra. Plazma szomatosztatin-szerű immunreaktivitás-változása diabéteszes és ciszplatinnal kezelt WT és TRPV1^{-/-} egerekben (n=8-10; átlag±SEM; *p<0.05 vs. kezeletlen csoport; #p<0.05 vs. kezeletlen).

III. 4. 2. Fejezet: SZINTETIKUS SST₄ AGONISTÁK HATÁSA AKUT ÉS KRÓNIKUS NOCICEPTÍV FOLYAMATOKRA

A TT-232 hatása a formalinnal kiváltott nocifenzív reakcióra patkányban

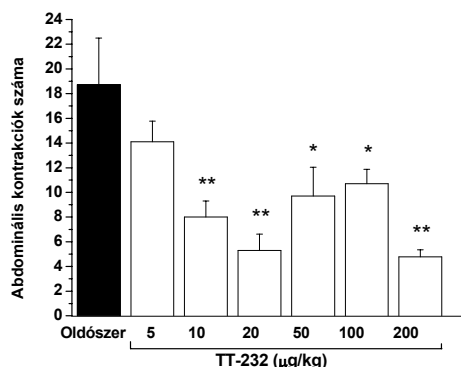
Az i.pl. formalin injekcióval kiváltott nocifenzív reakció első fázisát az összetett fájdalom pontszám (2x lábnyalások időtartama+1x lábemelések időtartama)/megfigyelési idő) értékelése alapján csak a 80 µg/kg i.p. TT-232 csökkentette szignifikánsan. A második fázisban harang alakú dózis-hatás görbét tapasztaltunk, mivel a 40 és 80 µg/kg i.p. dózisoknak szignifikáns antinociceptív hatása volt, de a 160 µg/kg már nem csökkentette a nocicepció pontszámot. A referencia-vegyületként alkalmazott diclofenac a második fázisban csak az 50 mg/kg i.p. dózisban gátolta szignifikánsan a nocifenzív magatartást (III/6. ábra).



III/6. ábra. A TT-232 hatása az intraplantáris formalin injekcióval kiváltott nocifenzív reakcióra. Az oszlopok 9-10 patkány eredményeinek átlagát±SEM mutatják, *p<0.05, **p<0.01 vs. oldószeres csoport).

A TT-232 hatása a fenilkinonnal kiváltott abdominális konstriktóra egérben

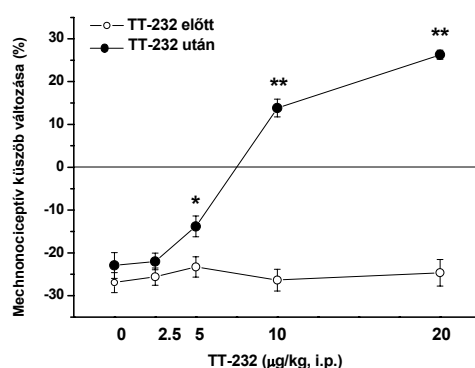
A TT-232-előkezelés (10-200 µg/kg s.c.) szignifikánsan csökkentette az i.p. fenilkinonnal kiváltott „writhing” mozdulatok számát, azonban dózis-hatás összefüggés nem volt. A 20 és 200 µg/kg dózisok eredményezték a legnagyobb mértékű gátlást (70, illetve 75%-os csökkenés), míg a köztes dózisok harang alakú dózis-hatás görbét eredményeztek, a formalin tesztben tapasztaltakhoz hasonlóan (III/7. ábra).



III/7. ábra. A TT-232-kezelés hatása a fenilkinonnal kiváltott viszerális kemonocicepcióra egérben (n=9-10; átlag±SEM (*p<0.05, **p<0.01 vs. oldószer).

A TT-232 hatása a mechanikai allodiniára traumás mononeuropátiában patkányban

A TT-232 (2.5-20 µg/kg i.p.) dózisfüggő gátló hatást fejtett ki a n. ischiadicus lekötés következtében kialakuló mechanonociceptív küszöbcsökkenésre a műtét utáni 7. napon. Figyelemreméltó, hogy a 10 és a 20 µg/kg dózisok mechanonociceptív küszöbemelkedést okoztak, azaz hipoalgéziába fordították az allodiniát (**III/8. ábra**).

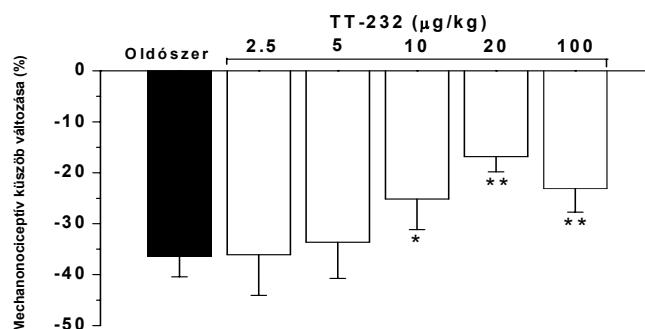


III/8. ábra. A TT-232 hatása a n. ischiadicus lekötéssel kiváltott mechanikai allodiniára (n=6-8; átlag±SEM.; *p<0.05, **p<0.01 vs. TT-232 adás előtt).

A TT-232 hatása a diabéteszes neuropátiás mechanikai allodiniára patkányban

A streptozotocin-kezelés után a diabétesz mellitusz jellegzetes tünetei alakultak ki: poliuria, polidipszia, polifágia és testsúlycsökkenés. Két héttel a kezelés után minden állatban kifejlődött a cukorbetegség, vércukorszintjük 23.6±2.8 mmol/l volt. A mechanonociceptív küszöb 5 héttel a kezelés után 28.6±3.1%-kal csökkent. A TT-232 (10, 20 és 100 µg/kg-os i.p.) szignifikánsan csökkentette a mechanikai allodiniát, a 20 µg/kg fejtette ki a maximális,

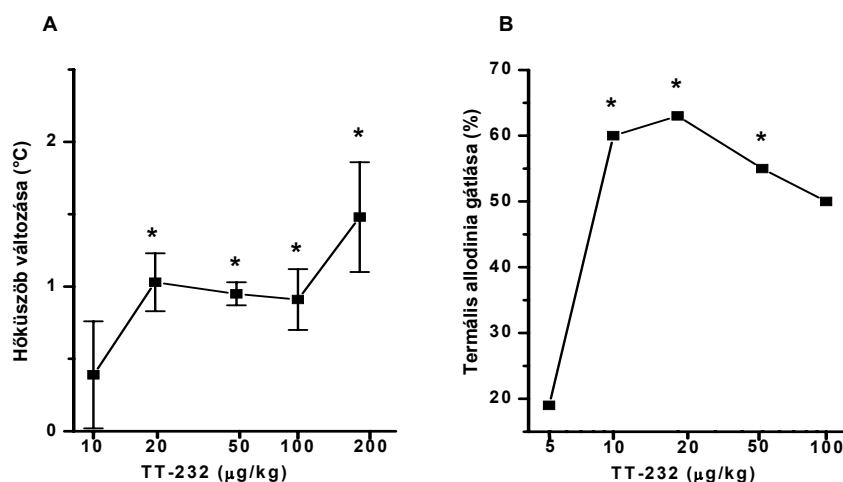
54%-os gátlást (**II/9. ábra**). Egészséges patkányokban 20 µg/kg TT-232 nem befolyásolta a mechanikai küszöböt.



III/9. ábra. TT-232 hatása a diabéteszes neuropátiás mechanikai allodiniára (n=6-9; átlag±SEM; *p<0.05, **p<0.01 vs. oldószer).

TT-232 hatása a nociceptív hőküszöbre és az RTX-szel kiváltott termális allodiniára

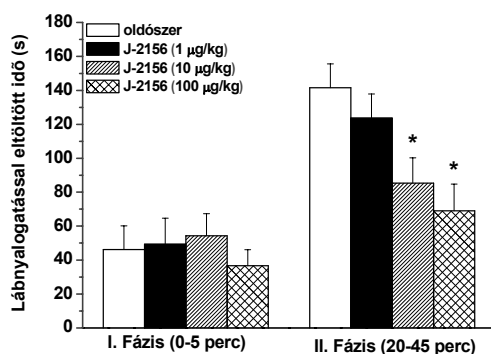
Patkányok kontroll hőküszöbe 44.5±0.2°C volt, amelyet a TT-232 szignifikánsan megemelt a 20-200 µg/kg-os i.p. dózistartományban. Egyértelmű dózis-hatás összefüggést nem tapasztaltunk, maximális küszöbemelkedést (1.48±0.4°C) a 200 µg/kg eredményezett (**III/10. A. ábra**). Az i.pl. RTX 7.39±1.3°C-os küszöbcsökkenést váltott ki 5 perccel a beadás után. A TT-232-előkezelés ezt szignifikánsan csökkentette 10-50 µg/kg i.p. dózisokban, azonban az ennél magasabb, 100 µg/kg-os dózis hatása már nem volt szignifikáns (**III/10. B. ábra**).



III/10. ábra. TT-232 hatása (A) a nociceptív hőküszöbre és (B) az RTX-szel kiváltott termális allodiniára (n=8-12; átlag±SEM; *p<0.05 vs. kezelés előtti kontroll).

A J-2156 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív reakcióra egérben

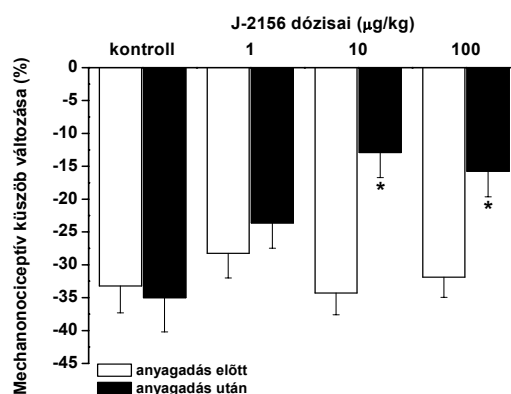
A formalin teszt első fázisában az oldószerrel kezelt és a különböző dózisú i.p. J-2156-tal kezelt állatcsoportok közel azonos ideig tartó elhárító viselkedést (lábnyalás) mutattak. Az akut gyulladásos folyamatok következtében kialakuló második szakaszban kb. háromszorosára nőtt e nocifenzív reakció időtartama az oldószerrel kezelt kontroll csoportban, amelyre azonban a J-2156 szignifikáns és dózisfüggő gátló hatást gyakorolt (III/11. ábra).



III/11. ábra. A J-2156 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív reakcióra (n=9-10; átlag±SEM; *p<0.05 vs. oldószer).

A J-2156 hatása a mechanikai hiperalgéziára traumás mononeuropátia modellben

A n. ischiadicus részleges lekötése az operált láb mechanonociceptív küszöbének 30-35%-os csökkenését okozta 7 nappal a műtét után. Ezt a neuropátiás hiperalgéziát az 1 µg/kg J-2156-kezelés az oldószerhez hasonlóan nem befolyásolta. A két nagyobb J-2156 dózis azonban a hiperalgéziát a kontroll felére, az operáció előtti mechanonociceptív küszöbhez viszonyítva közel 15-18%-ra csökkentette. Dózis-hatás összefüggést nem tapasztaltunk (III/12. ábra).

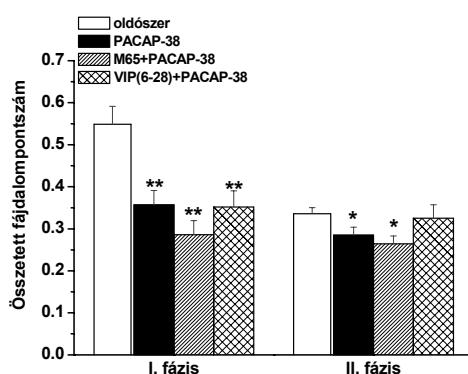


III/12. ábra. A J-2156 hatása a mechanikai hiperalgéziára traumás mononeuropátia modellben (n=6-9; átlag±SEM; *p<0.05 vs. oldószer).

III. 4. 3. Fejezet: A PACAP-38 ELTÉRŐ PERIFÉRIÁS HATÁSAI NOCICEPCIÓ MODELLEKBEN

Intraplantáris PACAP-38 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre

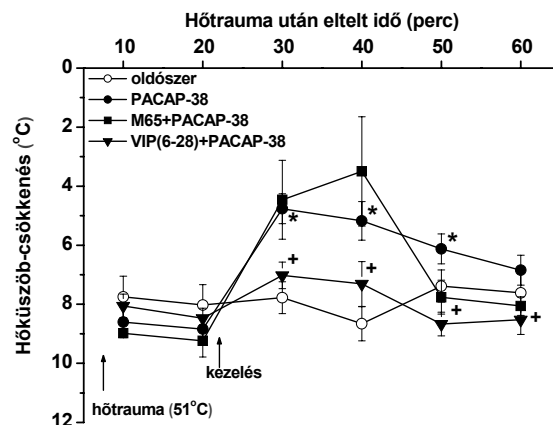
Patkányban a formalin-injekció utáni első 5 percben a lábemelések száma és lábnyalások időtartama alapján meghatározott összetett fájdalom pontszámot az i.pl. PACAP-38 szignifikánsan csökkentette. A második fázisban az akut gyulladásos folyamatok következtében kialakuló nocifenzív reakciókat ugyancsak szignifikánsan gátolta a lokális PACAP-38-előkezelés, de az akut fázisban tapasztaltnál kisebb mértékben. A PAC₁ receptor-szelektív antagonistá M65-előkezelés egyik fázisban sem befolyásolta a PACAP-38 gátló hatását. A VPAC₁/VPAC₂ receptor antagonistá VIP(6-28) sem csökkentette a PACAP-38 gátló hatását az akut kemonociceptív fázisban, ezzel szemben azonban megszüntette az antinociceptív hatást az akut gyulladás fázisában (III/13. ábra).



III/13. ábra. Intraplantáris PACAP-38 hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre (n=10-16; átlag±SEM; *p<0.05 és **p<0.01 vs. oldószer).

Intraplantáris PACAP-38 hatása enyhe hőtraumával kiváltott termális allodiniára

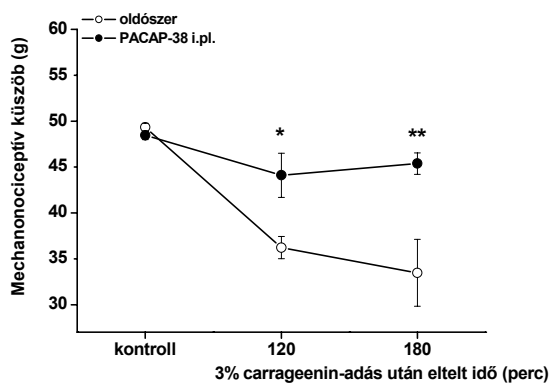
A patkányok átlagos kontroll hőküszöbe 42.8±0.2°C volt. Az 51°C-os enyhe hőtrauma utáni 10. és 20. percben mért hőküszöbök jelentősen lecsökkentek, átlagosan 34.4±0.6°C értékre. Az oldószerrel kezelt csoportban ez a 8-9°C-os termális allodinia a 60 perces kísérleti periódus alatt szinte változatlanul fennmaradt. A PACAP-38 lokális injekciója szignifikánsan, átlagosan 50%-kal gátolta a hőtraumával kiváltott allodiniát, ami 4.5-6.5°C-os küszöbcsökkenést jelentett. A PAC₁ receptor antagonistával történő előkezelés nem befolyásolta a PACAP-38 antiallodiniás hatását egyik mérési pontban sem. A VPAC₁/VPAC₂ receptor antagonistá ezzel szemben minden mérési időpontban megszüntette a PACAP-38 gátló hatását (III/14. ábra).



III/14. ábra. Intraplantáris PACAP-38 hatása enyhe hőtraumával kiváltott termális allodiniára (n=10-14; átlag±SEM; *p<0.05 vs. oldószer, +p<0.05 vs. PACAP-38).

Intraplantáris PACAP-38 hatása a carrageeninnel kiváltott mechanikai allodiniára

A carrageenin patkányokban a 2. és 3. órában $26.5 \pm 4.2\%$ és $26.2 \pm 4.2\%$ mechanonociceptív küszöbcsökkenést okozott. A mérések előtt 5 perccel történő PACAP-38-előkezelés mindkét időpontban szignifikánsan csökkentette ezt a gyulladásos allodiniát, a 2. órában $9.0 \pm 2.7\%$, a 3. órában $6.3 \pm 2.2\%$ értékeket mértünk. A mechanonociceptív küszöbök abszolútértékeinek változását a **III/15. ábra** mutatja.



III/15. ábra. Intraplantáris PACAP-38 hatása a carrageeninnel kiváltott mechanikai allodiniára (n=10; átlag±SEM; *p<0.05, **p<0.01 vs. oldószer).

Intraplantáris PACAP-38 hatása a mechano- és termonociceptív küszöbökre

Patkány talpának mechanikai fájdalomküszöbe 46.6 ± 1.5 g volt 100 µl 2 µM PACAP-38 lokális beadása előtt és 44.1 ± 1.5 g 10 perccel utána. A láb hőküszöbe $42.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ -nak adódott PACAP-adás előtt és $42.3 \pm 0.4^\circ\text{C}$ -nak 10 perccel adás után. A PACAP-38 e dózisa tehát önmagában nem befolyásolta a nociceptív küszöböket.

A PACAP-38 perifériás hatása az akut viscerális kemonocicepcióra egérben

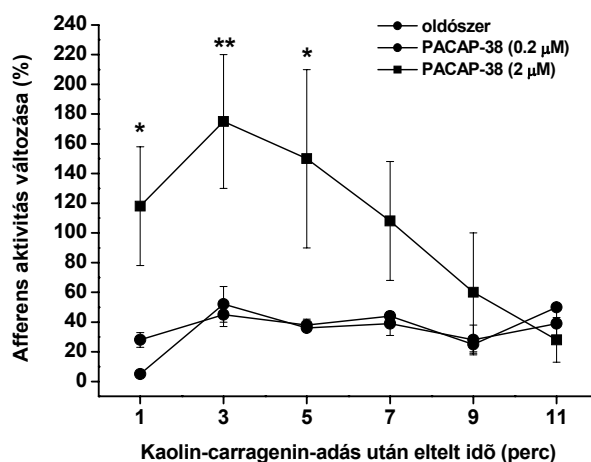
Ecetsav i.p. injekciója akut izgató hatására a kontroll csoportban az egerek a 20 perces vizsgálati periódus alatt 63.3 ± 2.8 vonaglást végeztek. PACAP-38 (s.c.) ezt 54.5 ± 2.9 -re csökkentette, tehát a PACAP ebben az egérmodellben is antinociceptív hatást fejtett ki.

A PACAP-38 hatása neuropátiás mechanikai hiperalgéziára egérben

A műtétet követő 7. napon 43-47%-os mechanikai hiperalgécia alakult ki az egerek érintett végtagjában, amelyet i.p. adott PACAP-38 egyik dózisa sem volt képes szignifikánsan csökkenteni, így ebben a modellben a PACAP hatástalannak bizonyult.

PACAP-38 perifériás hatása az afferens-aktivitására gyulladt térdízületben

A kaolin-carragenin-injekció hatására a térdízületben 3 óra múlva gyulladás alakult ki, amelyet szignifikáns duzzadás bizonyított. A $2 \mu\text{M}$ PACAP-38 lokális adása átmenetileg, de szignifikánsan fokozta a térdízületi primér afferensek aktivitását. Ez a szenzitizáló hatás a kisebb, $0.2 \mu\text{M}$ PACAP-38 esetén nem volt megfigyelhető (III/16. ábra).

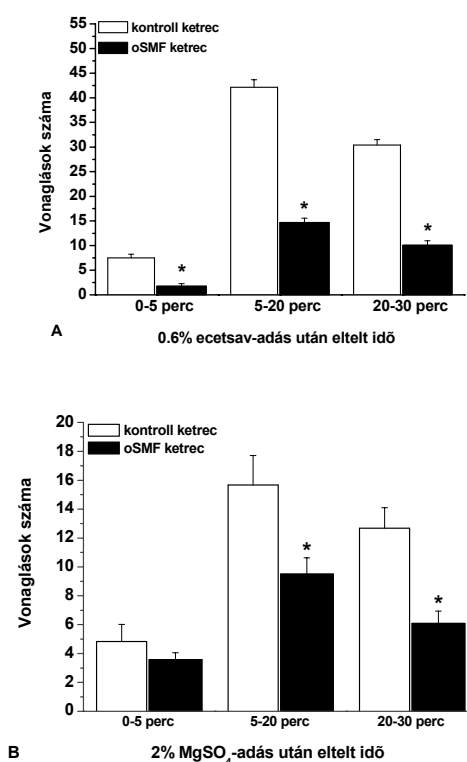


III/16. ábra. A PACAP-38 perifériás hatása a gyulladt térdízületi afferensek aktivitására (n=9-12; átlag \pm SEM.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. oldószer).

III. 4. 4. Fejezet: A SZTATIKUS MÁGNESES TÉR ANTINOCICEPTÍV HATÁSA ÉS A HÁTTÉRBE ÁLLÓ MECHANIZMUSOK

Az oSMF hatása az akut viscerális kemonocicepcióra

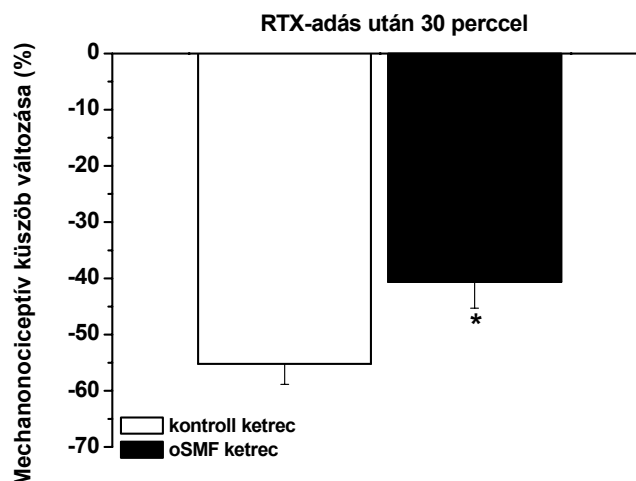
Az i.p. injektált ecetsav hatására a kontroll ketrecben tartott egerek vonaglásoknak száma a teljes 30 perces periódusban 110.1 ± 3.4 volt. Az oSMF-ben tartott egerek ezzel szemben szignifikánsan, 72%-kal kevesebb nocifenzív reakciót mutattak (III/17. A. ábra). Bár az i.p. MgSO_4 -oldat kisebb mértékű nocifenzív reakciót okozott, mint az ecetsav, az oSMF ezt is átlagban 47%-kal csökkentette (III/17. B. ábra).



III/17. ábra. Az oSMF hatása (A) ecetsavval és (B) MgSO_4 -tal kiváltott akut viscerális kemonocicepcióra ($n=6-12$; átlag \pm SEM; * $p<0.05$ vs. kontroll).

Az oSMF hatása a TRPV1 aktivációval kiváltott mechanikai hiperalgéziára

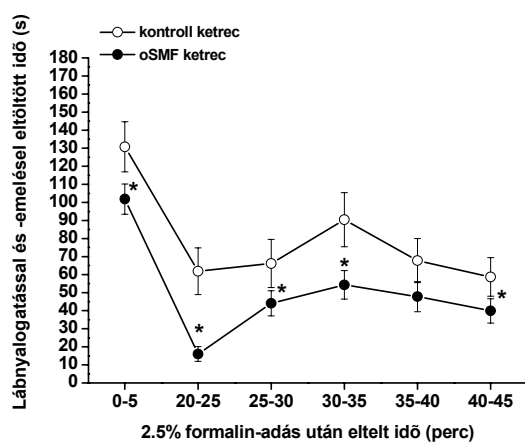
A TRPV1 agonista RTX intraplantáris injekciója kontroll egerekben fél órával a beadás után jelentős mértékben, 8.4 ± 0.2 g-ról 3.6 ± 0.3 g-ra csökkentette a mechanonociceptív küszöböket, ami a kezdeti értékekhez képest 55%-os hiperalgéziát jelent. Ugyanez az RTX-adás az oSMF-ben tartott állatokban mindössze 40.6%-os fájdalomküszöb-csökkenést váltott ki, 8.0 ± 0.4 g-ról csak 4.9 ± 0.4 g-ra változtak a küszöbértékek. Az oSMF tehát szignifikánsan gátolta a TRPV1 receptor aktivációjával kiváltott mechanikai hiperalgéziát a talpban (III/18. ábra).



III/18. ábra. Az oSMF hatása az RTX-szel kiváltott mechanikai hiperalgéziára (n=11; átlag±SEM; *p<0.05 vs. kontroll).

Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut szomatikus nocicepcióra

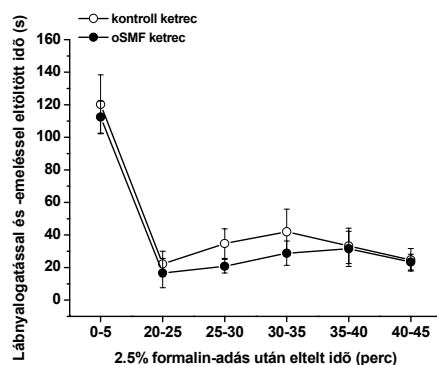
A formalin i.pl. injekciójára a teszt mindkét fázisában (0-5 perc és 20-45 perc) az oSMF-ben tartott állatok szignifikánsan rövidebb ideig tartó lábnyalással reagáltak a kontroll csoportban lévő egerek nocifenzív viselkedéséhez képest (III/19. ábra).



III/19. ábra. Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut szomatikus nocicepcióra (n=10; átlag±SEM; *p<0.05 vs. kontroll).

Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott nocifenzív reakciókra RTX-előkezelt egerekben

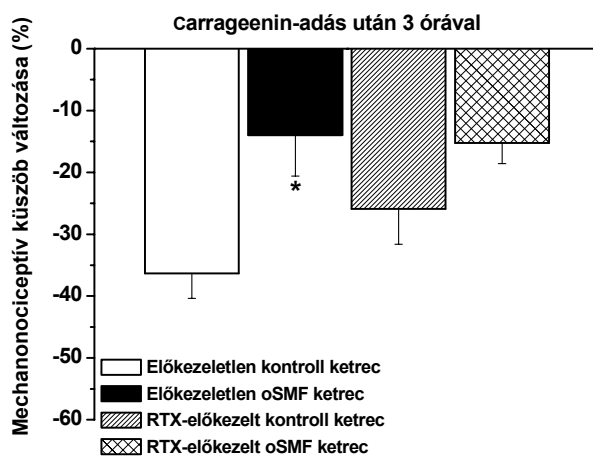
A kontroll csoportban a korábbi kísérletsorozathoz hasonló nocifenzív viselkedést tapasztaltunk mindkét fázisban i.pl. formalin-injekció hatására. Az oSMF antinociceptív hatása azonban a kapszaicin-érzékeny rostok RTX-előkezeléssel történő inaktiválása után elmaradt, mindkét fázisban a kontrollal megegyező értékeket kaptunk (III/20. ábra).



III/20. ábra. Az oSMF hatása a formalinnal kiváltott akut nocifenzív viselkedésre RTX-előkezelt állatokban (n=10; átlaga±SEM).

Az oSMF hatása gyulladásos mechanikai hiperalgéziára RTX-előkezelt egerekben

A kontroll csoportban a talp mechanonociceptív küszöbe 8.7 ± 0.2 g-ról 5.5 ± 0.2 g-ra csökkent 3 órával i.pl. carrageenin-adás után. Az oSMF-ben tartott egerekben a kezdeti 8.9 ± 0.3 g küszöb szignifikánsan kevésbé, csak 7.4 ± 0.7 g-ra csökkent. Az RTX-előkezelt állatokban a carrageenin a kezdeti 9.0 ± 0.1 g-ról 6.64 ± 0.5 g-ra csökkentette a küszöböt, ezekben az egerekben az oSMF hiperalgézia-csökkentő hatása nem volt szignifikáns (III/21. ábra).



III/21. ábra. Az oSMF hatása a carrageeninnel kiváltott hiperalgéziára RTX-előkezelt állatokban (n=6-8; átlag±SEM, *p<0.05 vs. kontroll).

Az oSMF hatása az egerek mozgáskordinációjára és motoros működésére

A 30 percig tartó oSMF expozíció nem befolyásolta az egerek rotarod készüléken nyújtott teljesítményét. A kontroll állatok átlagosan 46.5 ± 8.1 másodpercet töltöttek a dobon a ketrecbe helyezés előtt, és 65.9 ± 7.8 másodpercet utána. Ezek az értékek az oSMF-ben lévő ketrecben tartott egerek esetében 50.7 ± 5.5 másodperc, utána 63.6 ± 10.7 másodperc voltak.

III. 5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Az új gyógyszerek fejlesztésére fordított erőfeszítések ellenére a mai orvosi gyakorlatban használatos fájdalomcsillapító vegyületek lényegében két támadásponton fejtik ki hatásukat: az opioid receptorokon, illetve a prosztanoidok szintéziséért felelős ciklooxygenáz enzim gátlása révén. A klinikai gyakorlatban ezek a gyógyszerek többnyire jól csökkentik a gyulladásos, traumás vagy posztoperatív fájdalmat, azonban tartós használatukat hátráltatják a sokszor kellemetlen és potenciálisan súlyos mellékhatások, és ez megnehezíti a krónikus, például mozgásszervi betegségekhez vagy daganatokhoz társuló fájdalom kezelését. Új gyógyszerek fejlesztését teszi szükségessé az is, hogy a különböző eredetű krónikus neuropátiás fájdalom kórképekben az opioidok és a ciklooxygenáz-gátlók hatékonysága csekély. Az ún. adjuváns fájdalomcsillapítók (például triciklikus antidepresszánsok, antiepileptikumok) csak bizonyos típusú neuropátia és azon belül sem minden egyes beteg esetében hatásosak.

A fájdalomcsillapítás legszelektívebb módja a fájdalom-szignál kialakulásának megakadályozása lenne közvetlenül a nociceptoron, jelenleg azonban még nem rendelkezünk ilyen hatásmechanizmusú gyógyszerekkel. Az analgetikumok fejlesztési stratégiájának tehát fontos eleme az érzőideg-végződéseken található támadáspontok felderítése, illetve az ezeket befolyásoló lehetséges új gyógyszerjelöltek hatásának igazolása *in vivo*. A nociceptorok aktivációját szelektíven gátló anyagok kitüntetett fontosságúak lehetnek, mivel szelektivitásuk révén kedvezőbb mellékhatásprofilal rendelkezhetnek és hatékonyabbak lehetnek a neuropátiás fájdalom kezelésére is, mint a mai gyakorlatban használatos gyógyszerek.

A TRPV1 receptor különböző fizikai és kémiai jellegű fájdalmas ingereket integrál (Caterina et al. 1997; Tominaga et al. 1998), ezért maga a receptormolekula is fontos célpont lehet új típusú analgetikumok számára. Kísérleteink jelentős új információt szolgáltatnak a receptor akut és krónikus nociceptív folyamatokban betöltött szerepéről. A TRPV1 receptor génhiányos egerek vizsgálata során kimutattuk, hogy ez a fájdalmas ingerekkel aktiválható ioncsatorna kulcsfontosságú a forbolészterrel kiváltott akut nocicepció kialakulásában. A receptor hiánya nem befolyásolta a formalinnal kiváltott nocifenzív magatartást, a carrageninnel keltett gyulladásos, valamint a traumás eredetű mononeuropátiában kialakuló mechanikai hiperalgéziát. Krónikus diabéteszes, illetve toxikus eredetű polineuropátiában azonban protektív funkcióval rendelkezett, mivel jelenlétében a mechanikai hiperalgézia mérsékeltebb volt és később alakult ki.

A forbolésztér PMA a PKC aktivációja révén vált ki akut fájdalomreakciót. A PKC fontos eleme azon jelátviteli utaknak, amelyek a szövetsérülés vagy gyulladás következtében létrejövő hiperalgémia kialakulásában részt vesznek (Cesare és McNaughton 1996; Cesare et al. 1999). A TRPV1 receptor PKC általi foszforilációja annak jelentős szenzibilizációjához vezet (Premkumar és Ahern 2000; Vellani et al. 2001; Crandall et al. 2002), és ismert az is, hogy a bradikinin PKC aktiváción keresztül képes a TRPV1 receptor hőküszöbét csökkenteni *in vitro* (Sugiura et al. 2002). Jelen *in vivo* eredményeink magyarázata az lehet, hogy a forbolésztérrel aktivált PKC kizárólag a TRPV1 receptor foszforilációja és annak következményes szenzibilizációja/aktivációja által képes a nociceptorokat stimulálni.

A krónikus polineuropátiás hiperalgémia patomechanizmusa kevésbé tisztázott, a különböző eredetű állapotok közös jellemzője, hogy kialakulásukhoz az idegrostok valamilyen eredetű károsodása vezet. Hátterében mind a perifériás idegműködés, mind a centrális nociceptív transzmisszóban bekövetkező kóros aktivitás áll. A periférián a károsodott rost küszöbének csökkenése mellett kóros, ektópiás spontán aktivitás is kialakul, míg a neuron sejtestjében a neuropeptid expressziójának jelentős megváltozását írták le (Devor és Seltzer 1999; Ueda 2006). Mindemellett az ép afferensek funkcionális változásai is hozzájárulhatnak a hiperalgémiahoz, így vannak adatok arról, hogy a TRPV1 receptor expressziója is fokozódik az ép neuronokban (Hudson et al. 2001), illetve korábban nem kapszaicin-érzékeny neuronokon is megjelenik (Rashid et al. 2003). A TRPV1 receptor hiánya súlyosbította a mechanikai hiperalgémia diabéteszes és toxikus polineuropátia modellekben. Számos bizonyíték van arra, hogy a TRPV1 receptort expresszáló rostokból felszabaduló szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló hatást képes kifejteni (Szolcsányi et al. 1998a,b; Helyes et al. 2000; Carlton et al. 2001a,b; 2003; Helyes et al. 2004). Hasonló mechanizmusra utal az a megfigyelés, amely szerint a neuropátiás hiperalgémia elektroakupunktúrás kezelése során fokozódik a szomatosztatin expressziója a hátsógyöki ganglionokban (Dong et al. 2005). Hipotézisünk az volt, hogy a polineuropátiás állapotokban ez a szomatosztatin-mediált ellenregulációs mechanizmus aktiválódik, tehát kiesése ezért eredményezte a hiperalgémia fokozódását és korábbi megjelenését. Ezt igazolhatja az, hogy a plazma szomatosztatin koncentrációja a vad típusú polineuropátiás állatokban szignifikánsan megemelkedett, míg a TRPV1 receptor génhiányos egerekben a peptid szintje változatlan maradt.

A TRPV1 receptor tehát az adott kórfolyamattól függően pronociceptív vagy antinociceptív hatást is közvetíthet, agonisták és antagonisták egyaránt lehetnek analgetikum-jelöltek a megcélzott fájdalomállapot mechanizmusától függően.

Eredményeink megerősítették azokat a korábbi saját és irodalmi adatokat, amelyek szerint szomatosztatin (Carlton et al. 2001b; 2003; Helyes et al. 2004) tónusos gátló hatást fejt ki a nociceptorok működésére a periférián. Így az endogén opioidok mellett (Stein 1995) jelentős szerepük lehet a fájdalomtranszmisszió perifériás kontrolljában és a centrális leszálló gátló pályákkal együtt szabályozhatják a fájdalomérzet kialakulását. Azt is bizonyítottuk, hogy a kapszaicin-érzékeny afferensekből felszabaduló szomatosztatin bekerül a keringésbe és így nemcsak lokális, hanem szisztémás hatást is képes kiváltani (Szolcsányi et al. 1998a,b; Helyes et al. 2000, 2004). E folyamatok vizsgálata érdekes új kutatási terület lehet, mivel ennek az endogén regulációs mechanizmusnak a modulációja farmako- vagy fizioterápiás beavatkozásokkal új lehetőségeket nyithat a fájdalomcsillapításra. Celluláris szinten az antinociceptív hatás feltehetően annak a következménye, hogy a szomatosztatin G_i -proteinhez kapcsolt receptorain keresztül többek között serkenti a K^+ -csatornák és gátolja a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák működését, ezáltal hiperpolarizálja a neuront és csökkenti a transzmitterek exocitózist (Patel 1999). Ugyanezt eredményezi az adenilát-cikláz gátlása révén az intracelluláris cAMP-szint csökkentése.

Eredményeink igazolták, hogy a perifériás támadáspontú ss_{t4}/ss_{t1} receptor agonista TT-232 kifejezett analgetikus hatással rendelkezik különböző módon kiváltott nociceptív folyamatokban, patkányban és egérben egyaránt. A hagyományos kemonocicepció tesztekben, a termonocicepció vizsgálatára alkalmas új modellben, a traumás mononeuropátia és a diabéteszes polineuropátia modellekben egyaránt igen alacsony dózisban jelentős gátló hatást eredményezett. A TT-232 a formalin tesztben a diclofenacnál 1000-szer, a két termonocicepció tesztben pedig, korábbi eredményekkel összevetve (Almási et al. 2003), mind a morfinnál, mind a diclofenacnál körülbelül 300-szor potensebbnek bizonyult.

A formalin teszt első fázisa a nociceptorok közvetlen stimulációjának következménye, míg a második a fokozatosan kialakuló gyulladás következménye (Tjolsen et al. 1992). A TT-232 mindkét fázisban képes volt csökkenteni a nocifenzív viselkedést, ami arra utal, hogy képes a nociceptorok aktivációját, valamint a gyulladás által létrehozott szenzibilizációt is csökkenteni. Hasonlóképpen, a termonocicepció tesztekben egyaránt gátló hatású volt a kezeletlen állatok fájdalmas hőingerrel kiváltott reakciójára és a TRPV1 receptor agonistával előidézett termális hiperalgéziára. A TT-232 gyulladásgátló hatása döntően a G_i -proteinhez kötött ss_{t} -receptorokon keresztül jön létre (Pintér et al. 2002), antiproliferatív hatása azonban elsősorban tirozin-kináz gátlás következménye (Kéri et al. 1996). Antinociceptív és antihiperalgetikus hatásaiban mindkét folyamatnak lehet szerepe. A G_i -protein aktiváció következtében csökkentheti a nociceptorok ingerelhetőségét és a transzmitter-felszabadulást

(Weckbecker et al. 2003). Ismert azonban az is, hogy a szövetsérülés hatására felszabaduló idegnövekedési faktor (nerve growth factor; NGF) tirozin-kinázhoz kapcsolt receptorához (trkA) kötődve képes a kapszaicin-érzékeny nociceptorokat szenzibilizálni, illetve hiperalgéziát kiváltani (Lewin et al. 1993; Shu és Mendell 2001; Galoyan et al. 2003), ezért nem zárható ki, hogy a tirozin-kináz gátlás is hozzájárul az antinociceptív hatásokhoz.

Különböző sst receptor agonisták szintén analgetikus hatásúnak bizonyultak *in vivo* (Eschalier et al. 1991; Betoín et al. 1994; Carlton et al. 2001a). A TT-232 nagy előnye, hogy az sst₄/sst₁ receptoron keresztül hat (Helyes et al. 2005), ezért a szomatosztatin sst₂, sst₃ és sst₅ receptor-közvetítette számos endokrin mellékhatásától mentes. Tolerálhatóságát javítja az is, hogy a vér-agy gáton nem jut át (preklinikai dokumentáció), támadáspontja kizárólag perifériás. Ez azért is fontos, mert intratekális szomatosztatin-kezelés neurotoxikus hatásáról számoltak be (Gaumann és Yaksh 1988; Mollenholt et al. 1988). A TT-232 gyulladásgátló hatása dózisfüggőnek bizonyult (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002; Helyes et al. 2004), azonban a nociceptív vizsgálatok során többször is harang alakú dózis-hatás görbét tapasztaltunk. Az ennek hátterében álló mechanizmusok tisztázása további vizsgálatokat tesz szükségessé.

A peptidomimetikum J-2156, ami az sst₄ receptorhoz nagy affinitással és nagyfokú szelektivitással kötődő agonista, ugyancsak hatékony és széles spektrumú analgetikus hatást mutatott. Gátolta az akut nocifenzív reakciókat formalin tesztben, valamint a krónikus gyulladással (ld. előző témakör, CFA-artritisz modell) és neuropátiás mechanikai hiperalgéziát 10 és 100 µg/kg dózisokban. A maximális antinociceptív és antihiperalgetikus hatás kb. 50-70% volt, ami nagyon jelentős, de kisebb, mint a TT-232 esetében tapasztalt maximális gátlás. A TT-232 a traumás mononeuropátia modellben rendkívül hatékony volt, a 10 és 20 µg/kg dózisok hipoalgéziát okoztak. Figyelemreméltó különbség még az is, hogy a TT-232-vel ellentétben a J-2156 nem csökkentette a nocifenzív reakciókat a formalin teszt I. fázisában. Ez a hatékonyságbeli eltérés már az előző fejezetben bemutatott krónikus ízületi gyulladásmodellben is megfigyelhető volt, tehát ezek az eredmények megerősítik azt a korábban levont következtetést, hogy az TT-232 analgetikus hatásaiban az sst₁ receptorok aktivációja és/vagy a tirozin-kináz gátló hatás is szerepet játszhat. A J-2156 nagy előnye lehet azonban a TT-232-vel szemben nem-peptid szerkezete, ami az orális adagolást is lehetővé teszi. Eredményeink alapján az sst₄ receptor gyógyszerfejlesztési szempontból kiváló célpont lehet, mivel agonistái széles analgetikus spektrummal rendelkeznek, amely magába foglalja a nehezen kezelhető neuropátiás fájdalomállapotokat. Stabil, szelektív sst₄ agonisták tehát új, ígéretes utakat nyithatnak meg a fájdalomcsillapítás területén is.

Bár a PACAP-38 jelenlétét a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokban korábban több fajban is leírták (Moller et al. 1993; Mulder et al. 1994), csupán néhány, meglehetősen ellentmondó adat utal a nociceptív folyamatokban betöltött szerepére, kizárólag a központi idegrendszeri hatásokra fókuszálva. Számos kísérletben tapasztalták a közvetlenül a központi idegrendszerbe (intracerebroventrikulárisan, intratekálisan) injektált PACAP-38 eltérő hatásait a nocicepció közvetítésében (Zhang et al. 1996; Dickinson és Fleetwood-Walker 1999; Said 2000; Shimizu et al. 2004). Néhány munkacsoport azt találta, hogy a PACAP intratekális adása a motoros funkciók megzavarása nélkül csökkentette a formalinnal kiváltott nocifenzív választ (Yamamoto és Tatsuno 1995; Zhang et al. 1996). Mások ezzel szemben a PACAP pronociceptív hatását mutatták ki egér tail flick tesztben (Narita et al. 1996). Patkányokban a PACAP csökkentette a termális stimuláció hatására létrejövő lábemelési reakció latenciáját, valamint fokozta a gerincvelő hátsó szarvába közvetített nocicepciót (Ohsawa et al. 2002). A PACAP intratekális adását követően a korai fázisban megnőtt a termális stimulus kiváltotta reakcióidő, a későbbiekben azonban nőtt a farok emelgetésének és nyalogatásának száma (Shimizu et al. 2004). Jelen kísérletsorozatunk szolgáltatja az első eredményeket a PACAP hatásairól a perifériás nocicepcióval kapcsolatban. Bizonyítottuk, hogy a perifériásan adott PACAP-38 gátolja az akut szomatikus és viszcerális kemonocicepciót, a gyulladásos mechanikai allodiniát, és az enyhe hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziát mind patkányban, mind egérben. Ugyanakkor nem befolyásolja a mechanikai hiperalgéziát traumás neuropátia egérmodelljében, sőt fokozza a gyulladt térdízületben a mechanikai stimulációval kiváltott afferens aktivitást.

Bár a PACAP-38 kísérleteinkben tapasztalt antinociceptív és antihiperalgéziás hatásainak pontos celluláris mechanizmusa nem ismert, kísérleteinkben PAC₁ és VPAC₁/VPAC₂ receptorokon ható antagonistákkal egyértelműen kimutattuk, hogy a formalin teszt második fázisában, valamint a hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziában tapasztalt gátló PACAP-hatások VPAC receptoron keresztül valósulnak meg. Valószínűleg nem a nociceptoron kifejtett direkt hatásról van szó, ezek a receptorok ugyanis G_s- és G_q-fehérjékhez kötötten működnek, vagyis különféle szignáltranszdukciós útvonalakhoz kapcsolódva növelik az intracelluláris cAMP-, valamint a Ca²⁺-szintet (Vaudry et al. 2000; Laburthe et al. 2007) és ezzel neuronális stimulációt okoznak (Taiwo és Levine 1991; Taiwo et al. 1992; Spengler et al. 1993). Ugyanakkor hízósejtekben, makrofágokban és granulocitákban a megnövekedett cAMP-szint gátolja gyulladásos mediátorok, citokinek felszabadulását (Kuehl et al. 1987; Weston és Peachell 1998). A PACAP akut gyulladásmodellekben megfigyelt perifériás antinociceptív és antihiperalgéziás hatásait magyarázhatja a korábban már említett

pronociceptív neuropeptidek, illetve egyéb fájdalomkeltő és szenzitizáló hatású molekulák (bradikinin, prosztaglandinok, leukotriének) sejtekből való felszabadulásának gátlása. Az a megfigyelésünk, hogy a lokálisan adott PACAP-38 önmagában nem befolyásolta sem a mechanikai, sem a termális nociceptív küszöböt, arra utal, hogy nincs hatással a feszültségfüggő Na^+ -csatornákra, vagyis az általa kifejtett perifériás antinocicepcióban helyi érzéstelenítő-szerű hatás nem játszik szerepet. A formalin az ankirin-ismétlődéseket tartalmazó TRPA1 receptort aktiválja, amely az I. fázisban létrejövő kemonocifenzív reakcióért felelős (Macpherson et al. 2007). Ebben a fázisban a PACAP nagyon jelentős antinociceptív hatással rendelkezett. Ezt nem befolyásolta sem a PAC_1 , sem a VPAC receptor-antagonistával történő előkezelés, tehát ebben az esetben nem ezeken a receptorokon keresztül megvalósuló gátló hatásról beszélhetünk. Lehetséges eddig ismeretlen gátló PACAP receptor létezése, más receptorokon (kannabinoid, opioid, esetleg szomatosztatin) kifejtett hatás (Muller et al. 2007), valamint akár a PACAP TRPA1 receptort negatívan moduláló vagy antagonizáló képessége sem.

A PACAP-38 vizcerális és szomatikus nocicepcióban megfigyelt gátló hatásával ellentétben patkány gyulladt térdízületi afferensein végzett elektrofiziológiai mérések szenzitizáló hatást bizonyítottak. Ezen eredmények összhangban állnak korábbi adatokkal, melyek a VIP ízületi nocicepcióban betöltött szerepét vizsgálták. Lokálisan beadott VIP, a PACAP-hoz hasonlóan, szenzitizálta az ízületi primér afferenseket, amely VPAC receptor antagonistával gátlható (McDougall et al. 2006; Schuelert és McDougall 2006). A PACAP-38 aktiválja az ízületi tokban lévő szenzoros érzőideg-végződéseken található $\text{VPAC}_1/\text{VPAC}_2$ receptorokat is, ami az ízület mechanoszenzitivitásának fokozódásához vezet. A szenzitizáló hatás alapja a megemelkedett intracelluláris cAMP-szint, ami az adenilát cikláz, valamint a PKA aktiválásának következménye, de a foszfolipáz C aktiválásának is szerepe lehet e folyamatban (Taiwo és Levine 1991; Taiwo et al. 1992; Spengler et al. 1993). Humán mintákban kimutatták a VPAC receptort szinoviocitákon is (Juarranz et al. 2008), amelyek speciálisan az ízületben jelenlévő fibroblaszt-szerű sejtek és gyulladásos mediátorok, prosztaglandin E_2 , IL- 1β és $\text{TNF}\alpha$, szekréciójára képesek (Zheng et al. 2006). A szinoviális hízósejtekből felszabadul emellett hisztamin is, ami szintén fokozza az algogén hatást (Herbert et al. 2001). Ismert tény, hogy a VIP képes hízósejt-degranulációt kiváltani (Skofitsch et al. 1983), de nem zárható ki a PACAP szinoviocitákat és hízósejteket indirekt módon aktiváló hatása sem (McDougall és Barin 2005).

A gyulladt talpban és az ízületben a PACAP eltérő, látszólag ellentmondásos perifériás hatásait magyarázhatjuk egyrészt az egyes szervekben működő eltérő másodlagos messenger

mechanizmusokkal, eltérő receptor-expresszióval, másrészt a különböző gyulladások által kiváltott eltérő gyulladásos folyamatokkal, amelyek különböző gyulladásos sejteket és gyulladásos mediátorokat aktiválnak. A talpban tapasztalt gátló hatások minden bizonnyal az ízületben is jelentkeznek, itt azonban valószínűleg a direkt neuronális izgatás, valamint a speciálisan csak az ízületben jelenlévő szinoviociták aktivációja dominál.

Nem találtunk eltérést a mechanikai hiperalgégiában a PACAP szisztémás adását követően egér mononeuropátia modellben annak ellenére, hogy elektrofiziológiai bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy a PACAP és a VIP növeli a hátsó szarv neuronok aktivitását patkány mononeuropátiában (Dickinson és Fleetwood-Walker 1999). Hasonlóképpen, egy másik munkacsoport szerint PACAP-hiányos egerekben nem alakult ki neuropátiás termális hiperalgémia, mechanikai allodinia, vagyis feltételezhetően szükség van a PACAP-ra neuropátiás fájdalom kialakulásában (Mabuchi et al. 2004). Ezeket a különbségeket a PACAP periférián adott válaszaival magyarázhatjuk, hiszen ez a 38 aminosavból álló nagyméretű polipeptid intraperitoneális adást követően nem képes bejutni a központi idegrendszerbe. Összefoglalva tehát elmondható, hogy ezek a kísérletek igazolják elsőként a periférián a PACAP-38 jelentős szerepét a fájdalomérzet közvetítésében. Ezek a hatások azonban a nociceptív folyamatok patomechanizmusától függően eltérőek lehetnek: a nociceptorokon kifejtett közvetlen hatás stimuláló, szenzitizáló, bizonyos gyulladásos folyamatokban azonban antinociceptív, antihiperalgémikus, antiallodiniás hatást tapasztaltunk, amelyet a VPAC receptorok közvetítenek. A PACAP perifériás nocicepcióban betöltött szerepének és a háttérben álló pontos pontos molekuláris mechanizmusoknak a felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek.

A negyedik fejezetben bemutatott eredményeink az oSMF antinociceptív és antihiperalgémikus hatásait bizonyítják többféle egérmodellben. Az oSMF gátolta mind az ecetsavval, mind a $MgSO_4$ -tal kiváltott akut viscerális kemonocicepciót, amely hatás kifejezettebb volt az ecetsavval kiváltott vonaglási tesztben. Ez a különbség valószínűleg a kémiai anyagok eltérő fájdalomkeltő mechanizmusában keresendő: a $MgSO_4$ által okozott nocifenzív reakció elsősorban kemonociceptorok direkt stimulálásával jön létre, míg az ecetsav-indukálta vonaglás akut gyulladásos folyamatok eredménye (Gyires és Torma 1984).

A formalin teszt első, direkt kemonociceptív fázisban az oSMF antinociceptív hatásának hátterében a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekre történő Na^+ -beáramlás és a következményes akciós potenciál kialakulásának gátlása állhat. A II. fázisban tapasztalt gátló hatásban azonban az oSMF hatására a kapszaicin-érzékeny afferensekre történő csökkent Ca^{2+} -beáramlás és a neurogén gyulladásos reakciót kiváltó szenzoros neuropeptidok csökkent

felszabadulása is szerepet játszhat. Ezt a teóriát alátámasztják azon irodalmi adatok, amelyek az SMF Ca^{2+} - és Na^{+} -áramokat gátló és ezeken keresztül a neuronális excitabilitást csökkentő hatásaira vonatkoznak (Rosen 1996; Wieraszko 2000; Rosen 2003). Csökkent vizuális kiváltott potenciálokat és alacsonyabb spontán kisüléseket találtak macska nucleus geniculatus laterálisban mágneses expozíció hatására, amelyet a membrán mágnesezhető foszfolipid molekuláinak lassú visszarendeződésével és a következményes ioncsatorna-működés gátlásával magyaráztak (Rosen 2003). A kapszaicin-érzékeny afferensek RTX-előkezeléssel történő inaktiválása a formalin teszt I. fázisban nem, de a II. fázisban jelentősen csökkent nocifenzív reakciókat eredményezett. Ez arra utal, hogy a belőlük aktiváció hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidek (tachikininek, CGRP) szerepet játszanak a formalin kiváltotta akut gyulladásos reakció kialakulásában. Az oSMF formalinnal kiváltott nocifenzív reakciókat gátló hatása elmaradt az RTX-előkezelt egerekben.

A carrageenin farmakológiai modellekben gyakran használt gyulladáskeltő. Hatásában számos neurogén és nem-neurogén komponens vesz részt, amelyet gyulladásos neuropeptidek, citokinek és ciklooxygenáz termékek közvetítenek (Poole et al. 1995; Doi et al. 2002). A carrageeninnel kiváltott mechanikai hiperalgézia nem csökkent szignifikánsan az RTX-előkezelés után, amely arra utal, hogy a hiperalgéziában nem a kapszaicin-érzékeny rostokon játszanak meghatározó szerepet. Az oSMF ebben a modellben is jelentős mértékben gátolta a gyulladás következtében kialakuló mechanikai hiperalgéziát a kontroll csoportban, azonban szinte hatástalan volt az RTX-előkezelt állatokban.

Az oSMF csökkentette továbbá a TRPV1 receptor agonista RTX intraplantáris adása következtében kialakuló gyulladásos mechanikai hiperalgéziát. Az RTX szelektíven a TRPV1 ioncsatorna nyitásával vált ki akciós pontenciált és proinflammációs neuropeptid-felszabadulást az érintett területen. Ezek lokális neurogén gyulladást és a mechanonociceptív küszöb következményes csökkenését idézik elő.

Bár a pontos hatásmechanizmus egyelőre nem ismert, a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződéseknek biztosan fontos szerepük van az oSMF antinociceptív és antihiperalgéziás hatásainak közvetítésében, mivel e rostok inaktivációja után a tapasztalt gátló hatás elmaradt. Az SMF valószínűleg csökkenti a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekbe történő kation-beáramlást a feszültségfüggő ioncsatornák vagy ionotrop receptorok pl. a TRPV1 működésének gátlásával, és ezáltal az akciós potenciál kialakulását, valamint a pronociceptív neuropeptidek felszabadulását. Mindemellett azonban az oSMF centrális szenzitizációt gátló hatása és csökkent szinaptikus transzmisszió sem zárható ki. Kihangsúlyozandó, hogy a 30 percig tartó oSMF-expozíció nem befolyásolta a mozgáskoordinációt és a motoros aktivitást.

III. 6. A TÉMAKÖRBEN BEMUTATOTT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. TRPV1 receptor génhiányos egereken végzett kísérleteink jelentős új információkat szolgáltatottak ennek az ioncsatornának akut és krónikus nociceptív folyamatokban betöltött szerepéről. Arra a következtetésre jutottunk, hogy bizonyos akut fájdalomállapotok kifejlődéséhez elengedhetetlen a TRPV1 receptor jelenléte, másokban viszont nincs kizárólagos szerepe. Krónikus polineuropátia modellekben azonban a receptor hiánya meglepő módon súlyosbítja a mechanikai hiperalgéziát. Azt az elméletet, hogy a TRPV1 receptor krónikus aktivációja következtében ellenregulációs folyamatok indulhatnak be, amelyeknek mediátora a kapszaicin-érzékeny afferensekből felszabaduló és a keringésbe jutó szomatosztatin, a plazma szomatosztatin koncentrációjának mérésével alátámasztottuk. A TRPV1 receptor tehát az adott kórfolyamattól függően pronociceptív vagy antinociceptív hatást is közvetíthet, tehát agonistákból és antagonistákból egyaránt lehetnek analgetikum-jelöltek a megcélzott fájdalomállapot mechanizmusától függően.

2. Szintetikus szomatosztatin sst₄ receptor agonista vegyületek, a TT-232 és a J-2156, segítségével bizonyítékokat szolgáltatunk e receptor fájdalomcsillapító (antiallodiniás/antihiperalgéziás) szerepére különféle egér- és patkánymodellben. Nagy jelentőséggel bír, hogy e vegyületek csökkentették a mechanikai allodiniát/hiperalgéziát traumás neuropátiában, amelyre a klasszikus nem-szteroid és opioid szerkezetű fájdalomcsillapítók hatástalanok. Bár bizonyos neuropátiás fájdalom-állapotok kezelésében az utóbbi években egyes antiepileptikumok és antidepresszánsok jelentős előrelépést jelentettek, e kórképek terápiája még mindig nem megoldott probléma. A szenzoros idegvégződéseken is lokalizálódó sst₄ receptor tehát ígéretes célpontot jelenthet egy teljesen új mechanizmusú fájdalomcsillapító gyógyszercsoport kifejlesztésére.

3. Jelen eredményeink az elsők a PACAP-38 nociceptív folyamatokra kifejtett perifériás hatásaira vonatkozóan. Bár térdízületben egyrost-elvezetési elektrofiziológiai vizsgálatok a lokálisan alkalmazott PACAP-38 VIP-hez hasonló szenzitizáló hatását bizonyították, számos, elsősorban gyulladásos egér- és patkánymodellben perifériás antinociceptív és antihiperalgéziás hatást tapasztaltunk, amelyeket a VPAC receptorok közvetítenek. Ennek a látszólagos ellentmondásnak magyarázata lehet az a tény, hogy a PACAP receptorainak

aktivációja következtében a megnövekedett intracelluláris cAMP-szint neuronokon excitációt okoz ugyan, de gyulladásos sejteken csökkenti a gyulladáskeltő mediátorok, citokinek felszabadulását. Mindezek alapján a nocicepcióra kifejtett eredő gátlás nagy valószínűséggel nem az idegvégződéseken megvalósuló közvetlen hatás eredménye, hanem a gyulladásgátló mechanizmuson alapuló indirekt folyamat. Ezen eredmények gyakorlati jelentőségének és a PACAP-ban rejlő gyógyszerfejlesztési perspektíváknak a felderítése még további vizsgálatokat igényel.

4. A farmakológiai megközelítéseken túl egy alternatív fájdalomcsillapító lehetőség, a sztatikus mágneses tér hatásainak állatkísérletes vizsgálatát is végeztük. E kísérletsorozat eredményei azt mutatják, hogy az előzetesen optimalizált oSMF antinociceptív és antihiperalgetikus hatású különféle egér nocicepció és hiperalgédia modellekben. A tapasztalt gátló hatás mechanizmusában egyértelműen igazoltuk a kapszaicin-érzékeny érzőrostok szerepét. Bár a pontos molekuláris folyamatok felderítése még további vizsgálatokat igényel, valószínűsíthető ezen afferenseken lévő feszültségfüggő ioncsatornák (Na^+ , Ca^{2+}), esetleg a TRPV1 receptor/kationcsatorna működésének oSMF-kiváltotta gátlása. E mechanizmusokon keresztül az oSMF feltehetően akadályozza az akciós potenciál kialakulását és terjedését, valamint csökkenti a pronociceptív neuropeptidok felszabadulását. A mágneses tér ilyen irányú felhasználása érdekes új irányokat mutathat a fájdalomcsillapító terápiában.

IV. TÉMAKÖR

A SZELEKTÍV SST₄ RECEPTOR AGONISTA J-2156, A PACAP-38 ÉS AZ ENDOMORFIN-1 HATÁSAINAK HÁTTERÉBEN ÁLLÓ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA AKUT GYULLADÁSMODELLEKBEN

IV. 1. BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK

Az előző témakörökben légúti és ízületi gyulladás-, valamint polineuropátia modellekben ismertettem a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló szomatosztatin szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív/antihyperalgéziás hatásait, amelyeket elsősorban az sst₄ receptor aktivációjával fejt ki. Bemutattam továbbá szintetikus sst₄ agonisták széles spektrumú gyulladásgátló és analgetikus hatásait is ezekben az állatkísérletes modellekben. Bár a hatásmechanizmusra vonatkozóan voltak közvetett adataink és ezek alapján levonható következtetéseink, a pontosabb sejtszintű hatások elemzésére további vizsgálatokat végeztünk *in vitro* rendszerekben és akut *in vivo* gyulladásmodellekben.

Számos –elsősorban immunhisztokémiai és molekuláris biológiai- irodalmi adat bizonyítja, hogy a szomatosztatinon kívül még más gátló hatással rendelkező neuropeptid mint pl. a PACAP-38, az opioid peptidek vagy a galanin is megtalálható a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekben (Helyes et al. 2009). Ezen afferensek által közvetített endogén ellenregulációs mechanizmusban saját kísérleteink elsősorban a szomatosztatin szerepének vizsgálatára irányultak és erre vonatkozóan megbízható bizonyítékokat szolgáltatunk. Ebben az irányban az alapkutatási eredményeinkből kiindulva már gyógyszerfejlesztési stádiumig jutottunk. Ennek ellenére elképzelhető, hogy a szomatosztatinnak nincs kizárólagos szerepe a kapszaicin-érzékeny rostok protektív funkciójában és más peptidek részvétele is felmerült. Annak érdekében, hogy komplexebb képet kapjunk a gátló neuropeptiderg mechanizmusokról, érdekesnek tűnt megvizsgálni a PACAP-38 és az endomorfín-1 hatásait azokban a kísérleti elrendezésekben, amelyekben a szomatosztatinra és az sst₄ agonistákra vonatkozóan már voltak adataink.

A PACAP jelenlétét morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel leírták különféle fajok kapszaicin-érzékeny neuronjaiban (Moller et al. 1993; Mulder et al. 1994), a

felszabadulásra és funkcióra vonatkozóan azonban nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Az irodalomban PACAP-felszabadulást írtak le 10^{-5} M kapszaicin hatására sertés antrumból (Tornøe et al. 2001), valamint elektromos ideg ingerlésre nyúl szemben (Wang et al. 1997). *In vivo* kapszaicinnel kiváltott PACAP-felszabadulást találtak a gerincvelőben (Zhang et al. 1997), azonban nem vizsgálták a felszabadulását a szisztémás keringésben.

A PACAP nem-neurogén gyulladásos komponensekre kifejtett hatásaira több irodalmi adat is rendelkezésre áll, amelyek gyulladásgátló hatásokat bizonyítanak (Ganea és Delgado 2002; Abad et al. 2006), azonban ezek elsősorban krónikus modellekből származnak és a gyulladásos sejtek funkcióira vonatkoznak. A PACAP i.p. injekciója egér kollagén-arthritisz modellben csökkentette a gyulladásos tüneteket (lábduzzadás, bőrpír, sejtes akkumuláció) a citokinszintézis/felszabadulás gátlásán keresztül (Abad et al. 2001), valamint az autoimmun encefalitisz súlyosságát az antigén-prezentáló sejtek funkciójának gátlásával (Kato et al. 2004). Pszoriázisos betegek bőrmintáin nyert eredmények is arra utalnak, hogy a PACAP szerepet játszik gyulladásos és immun-mediált folyamatokban (Steinhoff et al. 1999). Ezekkel az eredményekkel ellentétben azonban arra is vannak adatok, hogy lokálisan alkalmazott PACAP gyulladáskeltő hatásokat, értágulatot és plazmafehérje-kiáramlást okoz nyúl szemben (Wang et al. 1997). Intradermális PACAP injekció (10^{-14} - 10^{-9} M) hasonló akut gyulladásos válaszokat okozott patkány és nyúl bőrében a hízósejtekből történő hisztamin-felszabadításon keresztül (Warren et al. 1993; Cardell et al. 1997). A PACAP a trachea és a bronchusok területén simaizom relaxációt okoz (Foda et al. 1995; Shigyo et al. 1998), de a nyáktermelésre és a plazmafehérje-kiáramlásra kifejtett gátló hatásairól is beszámoltak (Shigyo et al. 1998). Shigyo és munkatársai több, mint 10 éve leírták, hogy a PACAP csökkenti a n. vagus ingerlésével kiváltott non-adrenerg non-kolinerg tracheakontrakciókat, de a kívülről beadott SP hatását nem befolyásolja (Shigyo et al. 1998). E megfigyelés alapján a szerzők feltételezték, hogy a PACAP gátolja az idegvégződésekből történő SP felszabadulást, konkrét kísérleti adataik azonban nem voltak erre vonatkozóan.

Különbő exogén opioid receptor agonisták neurogén gyulladást gátló hatásairól évtizedekkel ezelőtt beszámoltak (Barthó és Szolcsányi 1981). Az endomorfín-1 és 2 tetrapeptid szerkezetű endogén opioid peptidok, amelyek nagyfokú szelektivitást mutatnak a μ -opioid receptorokhoz (Zadina et al. 1997; Przewlocki és Przewlocka 2001). Neuroanatómiai lokalizációjuk számos élettani és patofiziológiai folyamatban, pl. vegetatív és neuroendokrin működések, kognitív funkciók, stresszreakciók és nociceptív szabályozásában betöltött potenciális szerepükre utal (Fichna et al. 2007; Horváth 2000). Az EM-1 a központi idegrendszerben főként az agyban található, míg az EM-2 lokalizációját és primér afferens

rostokból való felszabadulását elsősorban a gerincvelőben írták le és egyik fontos szerepének ezért a fájdalomtranszmisszió centrális gátlását tartották (Martin-Schild et al. 1997; Horváth 2000). Mivel az EM-1 intraplantáris adás után dózisfüggően, naloxonnal kivédhető módon gátolta a carrageninnel kiváltott gerincvelői c-Fos expressziót, hatásaiban perifériás μ -opioid receptor-közvetítette antinociceptív folyamatok is jelentős szerepet játszhatnak (Jin et al. 1999). Arra is vannak azonban adatok, hogy az EM-ok neuronokon kívül immunsejtekben is termelődnek, és immunmodulátor, valamint gyulladásgátló hatásokkal rendelkeznek (Jessop 2006). Morfológiai, molekuláris biológiai és elektrofiziológiai módszerekkel mindhárom opioid receptor (μ , δ és κ) jelentését kimutatták a primér szenzoros neuronok sejttestjén és a perifériás végződésein (Stein et al. 1990). A bőrben kiváltott gyulladás hatására a μ -opioid receptorok száma megnő a peptiderg afferenseken, azonban a neuronális EM koncentráció nem változik. Ez az eredmény elsősorban a gyulladásos sejtekből felszabaduló endomorfinek nocicepcióban és neurogén gyulladásban betöltött jelentőségére utal (Mousa et al. 2002). Az EM-1 lokális alkalmazása csökkentette akut térdízületi gyulladásban a szinoviális vérátáramlást és a plazmafehérje extravazációt patkányban (Barin és McDougall 2003; McDougall et al. 2004). Arra is vannak irodalmi adatok, hogy az EM-1 gátolja a n. ischiadicus antiodróm elektromos ingerlésével és az intradermális SP-vel kiváltott plazmafehérje-kiáramlást a patkány lábháti bőrén. Mivel a gyulladáscsökkentő hatás mértéke jelentősen kisebb volt az utóbbi esetben, a hatásban a szenzoros idegvégződéseken kifejtett prejunkcionális gátló mechanizmusokat is feltételezték (Khalil et al. 1999). Az EM-1 gyulladásgátló hatásait tehát valószínűleg több támadásponton fejti ki, ezt az elméletet azonban csak kevés, indirekt adat támasztotta alá (Przewlocki és Przewlocka 2001).

IV. 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célunk volt az sst₄ receptor aktiváció előző témakörökben bemutatott gyulladásgátló és antinociceptív hatásainak hátterében álló folyamatok vizsgálata különféle jól definiált mechanizmusú *in vitro* és *in vivo* modellekben. Ezekkel a kísérletekkel elsősorban arra kerestük a választ, hogy a betegségmodellekben tapasztalt gátló hatások milyen célsejteken valósulnak meg és hogy a komplex gyulladásos folyamatokban szerepet játszó neurogén és nem-neurogén tényezők közül melyik komponens gátlása dominál. Vizsgálatainkhoz a hatékony és szelektív sst₄ receptor agonista J-2156 vegyületet használtuk.

2. A PACAP-38 jelenlétét kimutatták ugyan a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronokban, felszabadulására és funkciójára vonatkozóan azonban nagyon kevés adat állt rendelkezésre. E fejezet első célkitűzése ezért a PACAP-38 perifériás afferensekből történő felszabadulásának vizsgálata volt *in vitro* és *in vivo* modellekben. Mivel a PACAP gyulladásban kifejtett hatásaira vonatkozóan ellentmondásos eredményeket találtunk, célunk volt annak a vizsgálata is, hogy a PACAP-38 hogyan befolyásolja a szenzoros idegvégződésekből történő neuropeptidfelszabadulást, valamint jól meghatározott mechanizmusokkal kialakuló akut gyulladásos folyamatokat.

3. Az endogén opioid peptid, az endomorfín-1, gyulladáscsökkentő hatásaira vonatkozóan volt néhány irodalmi adat, azonban arra, hogy e hatásokat milyen sejtes támadáspontokon, milyen mechanizmussal fejt ki, nem voltak közvetlen bizonyítékok. E témakör harmadik fejezetében bemutatott kísérletekben tehát arra kerestük a választ, hogy az EM-1-nek milyen hatása van prejunctionális és posztjunctionális szinten a neurogén gyulladásra, illetve befolyásolja-e a nem-neurogén folyamatokat.

IV. 3. KÍSÉRLETI MODELLEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Állatok

Ebben a témakörben bemutatott kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat, Balb/c és CD1 egereket használtunk, amelyek tenyésztésére, tartására és a kísérletek etikai hátterére vonatkozó adatokat az előző fejezetekben ismertettem. Itt is csupán a vizsgálati módszerek felvázolására törekszem a közleményekben megtalálható technikai részletek mellőzésével.

In vitro kísérletek

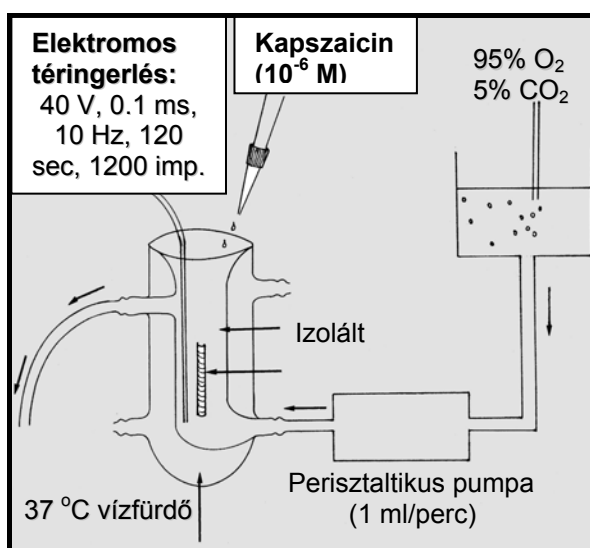
Szenzoros neuropeptid-felszabadulás vizsgálata izolált patkánytracheából

Az izolált patkánytracheákat (1.8 ml fürdőként 2-2 szerv) oxigenizált Krebs-oldattal 60 perces ekvilibrációs periódus alatt perfundáltuk. A trachea azért jó modellszerv szenzoros neuropeptid-felszabadulás vizsgálatára, mert nagyon gazdag kapszaicin-érzékeny innervációval rendelkezik és a végződések közel vannak a felszínhez, így könnyen stimulálhatók. Az átáramlás leállítását után a kamrákban lévő oldatot 8 percenként lecserélve három frakciót gyűjtöttünk. A frakcióból meghatározott neuropeptid-mennyiség jelenti az *ingerlés előtti*, bazális peptidfelszabadulást. A második periódusban történt a trachea afferens idegvégződéseinek stimulációja elektromos téringerléssel (ETI; 1200 impulzus: 40 V; 0.1 ms; 10 Hz; 120 s) vagy kémiai úton 10^{-6} M kapszaicinnal (*ingerelt frakció*). Ezekkel a paraméterekkel történő téringerlés szelektíven az idegvégződéseket stimulálja, mivel a feszültségfüggő gyors Na^+ -csatornák kizárólag idegelemekeken lokalizálódnak (Birmingham és Wilson 1963; Szolcsányi és Barthó 1982; Németh et al. 2003). A harmadik periódusban (*ingerlés utáni frakció*) már nem történt stimuláció, ebből a frakcióból az ingerlés utóhatásaként jelentkező peptidfelszabadulást mértük (**IV/1. ábra**). A vizsgálandó anyagokat minden periódus elején adtuk az inkubációs médiumhoz. A szervfürdőkből vett 200 μl mintákból a SP, CGRP, SOM és PACAP-38 koncentrációkat RIA módszerek segítségével határoztuk meg és fmol/mg nedves szövetsúlyra vonatkoztatva fejeztük ki (Németh et al. 1996, Helyes et al. 1997; Németh et al. 1998; Helyes et al. 2001)

Peritoneális makrofágok *in vitro* stimulálásával felszabaduló IL-1 β mérése

CD1 egereket i.p. kezeltünk *Salmonella typhimurium* LPS-sel (300 μl , 300 $\mu\text{g/ml}$). Négy órával az injekció után megjelennek a makrofágok a hasüregben, ekkor az állatokat dietil-éter altatásban kivérettük. A hasüreget jéghideg BSA-t tartalmazó RPMI-médiummal átmostuk,

majd a mosófolyadékban lévő aktivált makrofágokat egyik sorozatban LPS-sel, a másikban PMA-val sejtenyészítő lemezen stimuláltuk. Az LPS a Toll-like receptor aktivációjával, a PMA protein kináz C aktiválásán keresztül IL-1 β -felszabadulást okoz (Ulich et al. 1990; Blumberg 1988). A sejtenyészítő lemezt 37°C-os CO₂-os termosztátban 8 órán keresztül inkubáltuk. Centrifugálás után a felülúszók IL-1 β mennyiségét ELISA-val határoztuk meg. E sejtenyészítési módszert a Becton Dickinson Biosciences által megadott protokoll alapján az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben dolgozták ki, amit Sándor Katalin PhD hallgatóm módosított és állított be (Elekes et al. 2008).



IV/1. ábra. A trachea-perfúziós rendszer vázlatos rajza

In vivo kísérletek

E vizsgálataink során tisztán neurogén, illetve nem-neurogén mechanizmusú gyulladásmodelleket használtunk.

Mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata patkányban és egérben

A mustárolaj (allil-izotiocianát) szelektíven aktiválja a kapszaicin-érzékeny idegvégződéseket a TRPA1 (Jordt et al. 2004) ioncsatornán keresztül, így kizárólag neurogén mechanizmussal hoz létre gyulladást (Inoue et al. 1997; Bánvölgyi et al. 2004).

Mustárolajjal létrehozott plazmafehérje kiáramlás vizsgálata patkány lábháti bőrében

Altatott patkányokban mindkét oldali n. saphenust és n. ischiadicust átvágtuk 30 perccel a kísérletet megelőzően, hogy megakadályozzuk a mustárolaj nociceptív hatásából adódó reflexválaszokat. A baloldali végtag lábháti bőrét 1%-os mustárolajjal kentük, az ellenoldalon kontrollként paraffinolajat alkalmaztunk. A plazmafehérje-kiáramlás mértékét az Evans kék

akkumuláció módszerével határoztuk meg. Tíz perccel a mustárolajjal történő kenés előtt i.v. 50 mg/kg Evans kék festéket adtunk, amely erősen kötődik albuminhoz és a plazma extravazáció helyén akkumulálódik a gyulladt szövetekben (**IV/2. ábra**). Húsz perccel a gyulladás kiváltása után az állatokat elvéreztettük és a kimetszett bőrterületek festéktartalmát formamidban extraháltuk. Az oldat optikai denzitását, amely a gyulladás intenzitásával egyenesen arányos spektrofotométerrel határoztuk meg 620 nm-en. A mustárolajjal kent lábak eredményeiből az ellenoldali lábak eredményeit levontuk.

Mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata egérfülön

Balb/c egerek fülére altatásban 10 µl 1%-os mustárolajat kentünk és 3 órán keresztül mikrométerrel mértük a fülvastagságot, a duzzadást a kezdeti értékhez viszonyítva adtuk meg.



IV/2. ábra. Evans kék akkumuláció patkány lábháti bőrén

TRPV1 receptor agonistákkal kiváltott akut neurogén gyulladás vizsgálata patkányban

Akut denerváció után a gyulladást 100 µl 0.1 µg/ml RTX és egy másik csoportban 100 µg/ml kapszaicin bal talpba történő adásával váltottuk ki. A patkányokat 20 perccel később elvéreztettük, a talpi bőrt kimetsztük és a plazmafehérje-kiáramlást a fentiekben ismertetett Evans kék akkumulációs módszerrel határoztuk meg.

Bradikininnel kiváltott nem-neurogén gyulladás vizsgálata patkánylábán

A bradikinin nonapeptid (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), amelynek a B₁ receptora normál szövetekben nem expresszálódik, csak gyulladás és szövetkárosodás hatására indukálódik. A B₂ bradikinin receptor a kapszaicin-érzékeny idegvégződéseken is megtalálható, a protein kináz C által mediált úton szenzitizálja a TRPV1 receptorokat. A bradikinin a neurogén úttól függetlenül is okoz endothelfüggő vazodilatációt és érpermeabilitás-fokozódást, így az általa előidézett gyulladásban nem-neurogén komponensek is szerepet játszanak (Fortin és Marceau 2006). A neurogén tényezők kiküszöbölésére a

kísérleti állatok jobb hátsó végtagját a kísérletet előtt 5 nappal denerváltuk. A bradikinin (0.25 µg, 50 µl i.pl.) hatására 30 perc múlva kialakuló plazmaprotein-extravazációt altatott patkányokban az Evans kék akkumulációs módszerrel határoztuk meg.

Dextránnal kiváltott nem-neurogén lábduzzadás vizsgálata patkányban

A dextrán nagyméretű pozitív töltésű molekula, a hízósejtekből degranulációval gyulladásokeltő transzmittereket (hisztamin, bradikinin, leukotriének, prosztaglandinok, vérlemezke aktiváló faktor) szabadít fel (Selye 1965). Mivel a dextrán gyulladásokeltő hatásának létrejöttében indirekt módon neurogén tényezők is szerepelhetnek, ezek kiküszöbölésére a végtagot 5 nappal korábban denerváltuk. A lábduzzadást 100 µl 5%-os dextrán i.pl. adásával váltottunk ki, a térfogatot pletizmométerrel mértük dextrán-injekció után 10, 20, 30 perccel. Az ödémát a kontroll értékhez viszonyított százalékban fejeztük ki.

Carrageeninnel kiváltott akut lábduzzadás vizsgálata patkányban

A bal hátsó végtagba 100 µl 3%-os carrageenin oldatot injektáltunk i.pl., amely neurogén és nem-neurogén komponensekből álló gyulladásos reakciót idéztünk elő (Poole et al. 1995; Doi et al. 2002). Ebben a kísérletben a lábtérfogat-méréseket az előző témakörben bemutatott nocicepció mérésekhez hasonlóan 1, 2 és 3 óra múlva végeztük.

A kapszaicin-érzékeny afferensek stimulációja *in vivo* patkányban

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseken lévő TRPV1 receptorok szisztémás stimulációjára altatott patkányok farokvénájába RTX-et (3 µg/kg) injektáltunk.

A n. ischiadicusban futó afferensek lokális izgatására a perifériás csomópont platina elektródon történő antidrómos elektromos ingerlését végeztük (20 V, 0.5 ms, 5 Hz, 5 min; Szolcsányi et al. 1998a). A szimpatikus és mozgató idegek aktivációja következtében kialakuló hatások megakadályozására guanethidin- és pipecuronium-előkezelést alkalmaztunk 1 órával korábban, tracheakanülön keresztül mesterséges lélegeztetést végeztünk. Kontroll patkányokban a n. ischiadicust kipreparáltuk, átvágtuk és ingerlés nélkül az elektródra helyeztük.

Mindkét stimulációt követően öt perc múlva levett vérmintákból a plazma PACAP-38-koncentrációt RIA-val határoztuk meg (Németh et al. 2006).

IV. 4. EREDMÉNYEK

IV. 4. 1. Fejezet: A SZELEKTÍV SST₄ RECEPTOR AGONISTA J-2156 HATÁSAI KÜLÖNBÖZŐ MECHANIZMUSÚ *IN VITRO* ÉS *IN VIVO* AKUT GYULLADÁSMODELLEKBEN

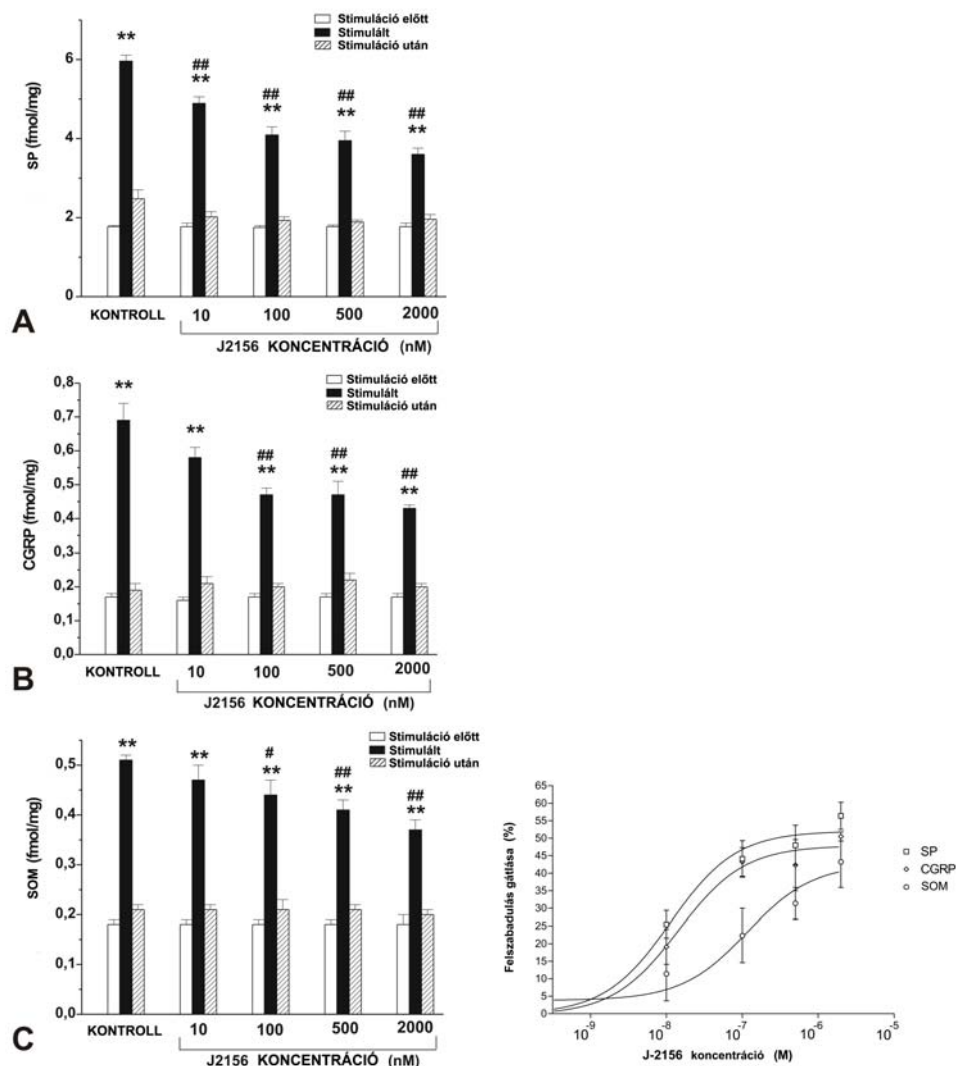
A J-2156 hatása a szenzoros neuropeptidek felszabadulására

Az elektromos téringerlés hatására a patkány tracheák kapszaicin-érzékeny idegvégződéseiből a bazális (stimulálás nélküli) SP-felszabadulás mintegy háromszorosára nőtt. A stimulálás hatására történő neuropeptid-felszabadulást a J-2156 a 10-2000 nM-os tartományban szignifikánsan, koncentrációfüggő módon gátolta, a 2000 nM mintegy 56%-os csökkenést eredményezett. A bazális és stimulálás utáni peptid-felszabadulásra a J-2156 nem volt hatással (*IV/3. A. ábra*). Az általunk vizsgált másik gyulladáskeltő neuropeptid, a CGRP esetében is hasonlóan szignifikáns gátlást tapasztaltunk, azzal a különbséggel, hogy a minimális effektív koncentráció 100 nM volt. A J-2156 2000 nM-os koncentrációban mintegy 50%-kal gátolta az elektromos téringerléssel kiváltott CGRP-felszabadulást (*IV/2. B. ábra*). A SOM felszabadulás volt a legkevésbé érzékeny a J-2156 gátló hatására. A minimális effektív koncentráció szintén 100 nM J-2156 volt, 2000 nM koncentrációban alkalmazva azonban csak 43%-os felszabadulás-gátlást értünk el (*IV/3. C. ábra*).

A koncentráció-hatás görbékről leolvasható, hogy a J-2156 gátló hatására legérzékenyebb a SP, míg legkevésbé érzékeny a SOM-felszabadulás volt. Az EC₅₀ értékek: SP 650.6 nM; CGRP 1.44 µM; SOM 11.02 µM (*IV/4. ábra*). A SOM-felszabadulás gátlása nem érte el az 50%-ot, így az ahhoz rendelhető EC₅₀ érték csak teoretikusan volt kiszámítható. A SOM felszabadulásának csökkentéséhez tehát nagyságrendekkel nagyobb J-2156 koncentrációk szükségesek, mint a gyulladáskeltő SP és CGRP felszabadulásának gátlásához.

A J-2156 hatása peritoneális makrofágok *in vitro* IL-1β termelésére

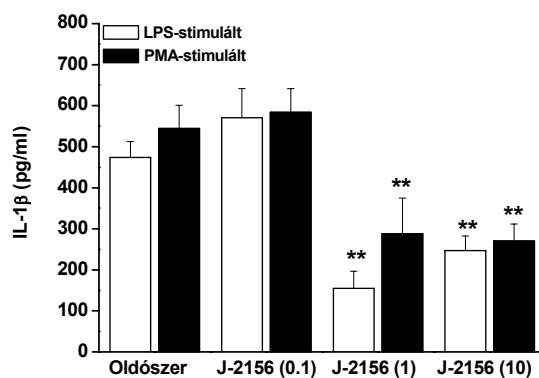
Az LPS- és a PMA-stimulálás IL-1β-termelést serkentő hatásai között nem tapasztaltunk eltérést. A 0.1 µg/ml J-2156 nem befolyásolta a citokin-termelést a kontroll sejtekkel összehasonlítva, az 1 µg/ml és a 10 µg/ml oldat szignifikáns, hasonló mértékű, kb. 50-60%-os gátlást okozott. Koncentráció-hatás összefüggés nem tapasztalható (*IV/5. ábra*).



IV/4. ábra. Koncentráció-hatás görbék.

A pontok n=6 kísérlet átlagait±SEM mutatják.

IV/3. ábra. A J-2156 hatása a téringerléssel kiváltott (A) SP, (B) CGRP és (C) SOM felszabadulásra (n=6; átlag±SEM; **p<0.01 vs. stimulált; #p<0.05, ##p<0.01 vs. kontroll).

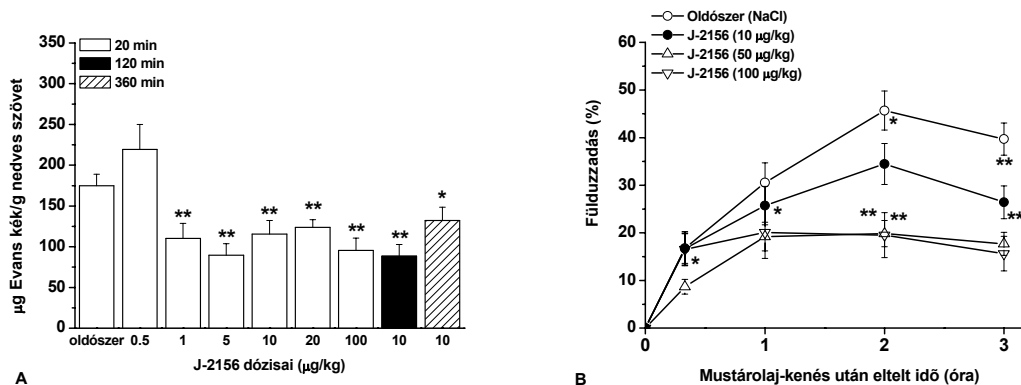


IV/5. ábra. A J-2156 hatása peritoneális makrofágok *in vitro* stimulálásával felszabaduló IL-1β-mennyiségre (16-20 mérés/csoport átlag±SEM, **p<0.01 vs. oldószer).

A J-2156 hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásra

A J-2156 1-100 $\mu\text{g/kg}$ i.p. dózistartományban közel azonos mértékű szignifikáns gátló hatást fejtett ki a mustárolajjal indukált Evans kék akkumulációra patkány lábhati bőrén. A 2, illetve 6 órás i.p. előkezelésben alkalmazott 10 $\mu\text{g/kg}$ J-2156 hasonló mértékben csökkentette a neurogén gyulladást (IV/6. A. ábra). Figyelemreméltó, hogy p.o. adás után 1 órával ugyancsak 40.2%-os, szignifikáns gyulladáscsökkentő hatást tapasztaltunk.

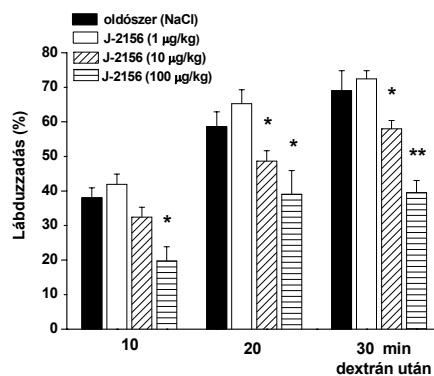
Kontroll egerekben a fülvastagság 262 ± 17 μm -ről 381 ± 26 μm -re duzzadt 3 órával a mustárolajjal történő kenés után. A J-2156 mindhárom dózisa (10, 50, 100 $\mu\text{g/kg}$ i.p.) 2 és 3 órával a kenés után szignifikánsan csökkentette a fülduzzadást, a 20. percben azonban csak az 50 $\mu\text{g/kg}$ dózis okozott gátlást. Dózis-hatás összefüggést itt sem tapasztaltunk (IV/6. B. ábra).



IV/6. ábra. A J-2156 hatása mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásra (A) patkány lábhati bőrén és (B) egérfülön (7-12 állat/csoport átlagai \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. oldószer).

A J-2156 hatása a dextánnal kiváltott nem-neurogén lábduzzadásra

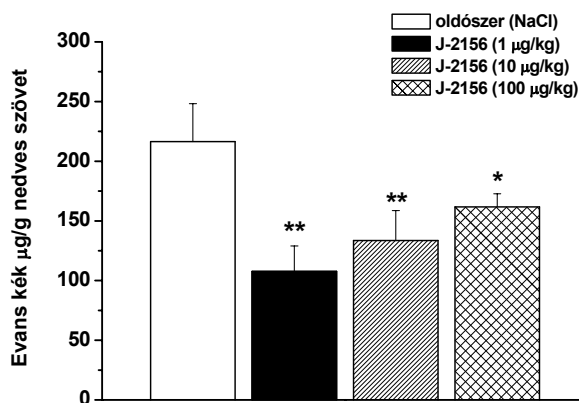
A J-2156 szignifikánsan, a neurogén gyulladással ellentétben dózisfüggően gátolta a nem-neurogén mechanizmusú lábduzzadást 10, 20, illetve 30 perccel a dextrán i.p.l. injekcióját követően. A minimális effektív dózis 10 $\mu\text{g/kg}$ volt (IV/7. ábra).



IV/7. ábra. A J-2156 hatása a nem-neurogén gyulladásra (átlag \pm SEM; $n = 6-21$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. NaCl).

A J-2156 hatása a bradikininnel kiváltott nem-neurogén gyulladásra patkányban

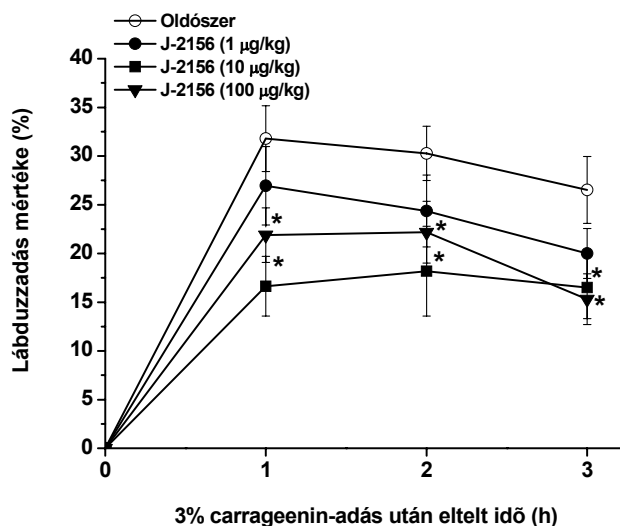
A J-2156 szignifikánsan gátolta a bradikininnel kiváltott Evans kék akkumulációt az alkalmazott három dózisban, dózis-hatás összefüggés azonban nem volt kimutatható. A legnagyobb mértékű 56%-os gátlás az 1 µg/kg dózis alkalmazásával érték el (IV/8. ábra).



IV/8. ábra. A J-2156 hatása a bradikininnel kiváltott nem-neurogén plazmaprotein kiáramlásra (n=6-21; átlag±SEM; *p<0.05, **p<0.01 vs. NaCl).

A J-2156 hatása a carrageeninnel kiváltott lábduzzadásra

A carrageeninnel kiváltott ödémaképződést a legkisebb dózisú i.p. J-2156 nem, de a 10 és a 100 µg/kg mindhárom mérési időpontban szignifikánsan csökkentette a kontroll csoporthoz képest. A duzzadásgátló hatás ebben a modellben sem volt dóziszfüggő (IV/9. ábra).

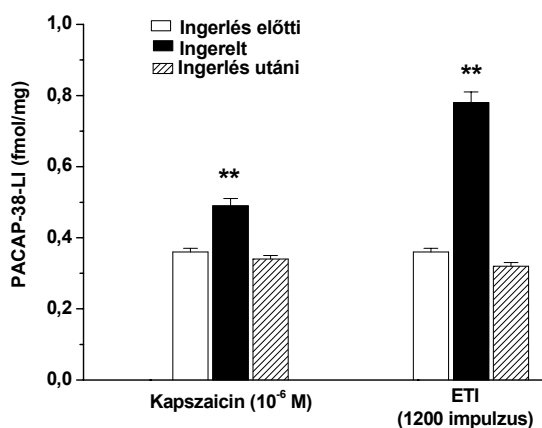


IV/9. ábra. J-2156 hatása a carrageeninnel kiváltott lábduzzadásra (n=6-9; átlag±SEM, *p<0.05 vs. oldószer).

IV. 4. 2. Fejezet: A PACAP-38 FELSZABADULÁSA A KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY AFFERENSEKBŐL ÉS HATÁSA AKUT GYULLADÁSOS FOLYAMATOKRA

A PACAP-38 felszabadulása izolált patkánytrachea érzőideg-végződéseiből

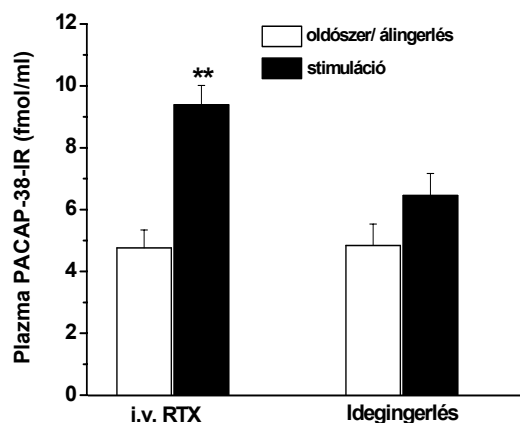
Kapszaicin (10^{-6} M) inkubációs médiumhoz történő hozzáadása szignifikáns, 27%-os PACAP-38 felszabadulást eredményezett az alapértékhez (stimuláció előtti frakció) viszonyítva. A C-rostokra szelektív elektromos téringerlés ugyanakkor több mint kétszeresére fokozta a szervfürdőben mért PACAP-szerű immunreaktivitást (PACAP-38-LI). Az ingerlés utáni frakcióban a PACAP-38 koncentráció visszatért a bazális szintre (IV/10. ábra).



IV/10. ábra. Kapszaicinnel és ETI-sel kiváltott PACAP-38 felszabadulás izolált patkány trachea érzőideg-végződéseiből (n=6; átlag \pm SEM; **p<0.01 vs. stimuláció előtti frakció).

A PACAP-38 felszabadulása a keringésbe a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések szisztémás stimulációjának hatására *in vivo*

A kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések testszerte történő kémiai izgatása i.v. RTX (3 μ g/kg) injekcióval altatott patkányokban kétszeresére növelte a plazma PACAP-38-szerű immunreaktivitását az oldószerrel kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezzel szemben mindkét n. ischiadicus antidrómos elektromos ingerlésének hatására nem változott a plazma PACAP-38 koncentrációja, a lábőr érző rostjainak lokális stimulációja nem volt elegendő a PACAP-38-IR szisztémás keringésben történő szignifikáns emelkedéséhez (IV/11. ábra).



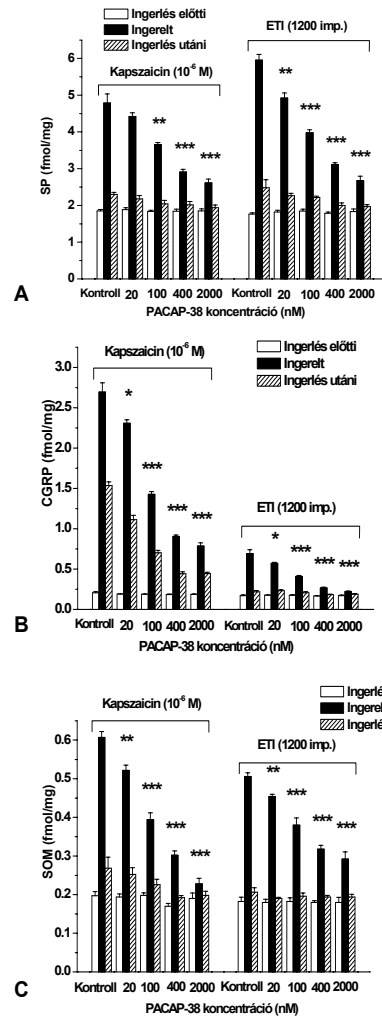
IV/11. ábra. Plazma PACAP-38-szerű immun-reaktivitásának változása i.v. RTX és a n. ischiadicus antidrómos ingerlésének hatására (n=6; átlag±SEM; **p<0.01 vs. oldószerrel kezelt/álingerelt csoport).

A PACAP-38 hatása a SP, CGRP és SOM felszabadulásra *in vitro*

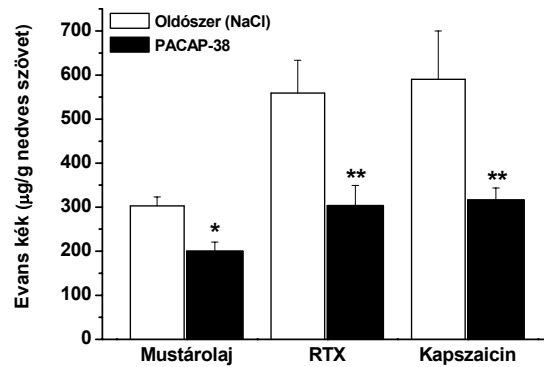
A kapszaicin (10^{-6} M) inkubációs médiumhoz történő hozzáadása 2.5-szeres SP, 11-szeres CGRP és 3-szoros SOM felszabadulást eredményezett. Hasonlóképpen a téringerlés (1200 impulzus) a SP koncentrációját 3-szorosára, a CGRP-jét 3.5-szeresére, a SOM-ét 2.5-szeresére növelte a szervfürdőben az ingerlés előtti frakcióban mért értékekhez viszonyítva. A PACAP-38 (20-2000 nM) koncentrációfüggő módon gátolta mindhárom peptid mind kémiai, mind elektromos stimulációval kiváltott felszabadulását, a bazális peptidkiáramlásra azonban nem volt hatással (**IV/12. A.,B.,C. ábra**). A PACAP-38 maximális hatása (hatékonysága) a kapszaicinnal kiváltott SP-, CGRP- és SOM-felszabadulásra 75.4%, 73.3% és 90.0% volt, a hatásereőséget mutató EC_{50} értékek a 95%-os konfidencia intervallummal 82.9 nM (45.3-151.0 nM), 60.1 nM (22.9-157.2 nM) és 66.9 nM (13.3–135.8 nM) voltak. Az elektromos téringerlés esetében a maximális gátlás 80.0%, 87.7% és 67.7%-nak adódott, az EC_{50} adatok 92.1 nM (9.9–185.1 nM), 67.8 nM (30.6–150.3 nM) és 20.9 nM (0.5–88.1 nM) voltak.

A PACAP-38 hatása a mustárolajjal, RTX-szel és kapszaicinnal kiváltott neurogén gyulladásra

A PACAP-38 (100 µg/kg i.p.) szignifikánsan, 37.8%-kal csökkentette a mustárolaj-kenéssel (TRPA1 ioncsatorna aktivációval) kiváltott plazmafehérje-kiáramlást patkány lábhati bőrben. A PACAP-38-előkezelés jelentősen gátolta továbbá mindkét TRPV1 receptor agonistával előidézett akut neurogén gyulladást a talpban, RTX esetében a gátló hatás 45.7%, kapszaicin esetében 46.4% volt a kontroll csoporthoz viszonyítva (**IV/13. ábra**).



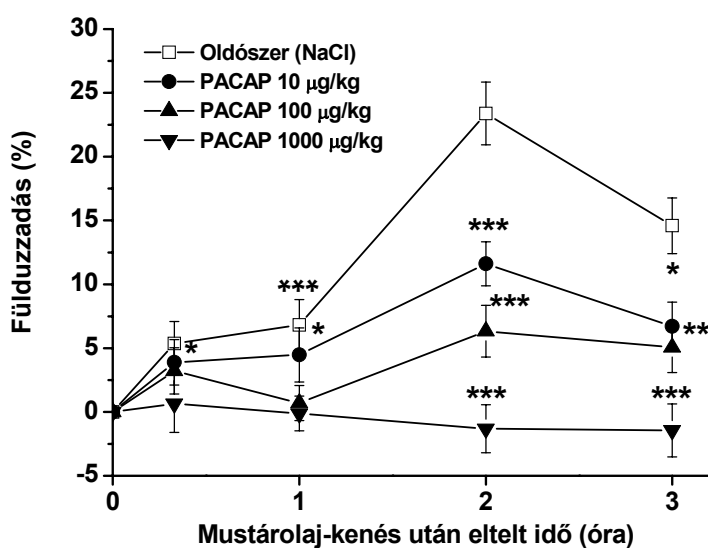
IV/12. ábra. A PACAP-38 hatása az elektromos téringerléssel kiváltott (A) SP, (B) CGRP és (C) SOM felszabadulására (n=6; $\text{átlag} \pm \text{SEM}$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. stimulált kontroll).



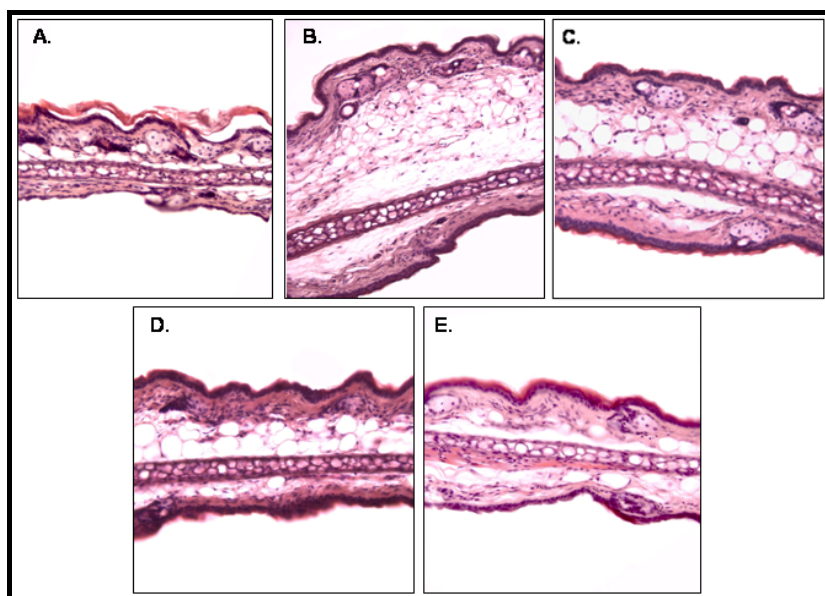
IV/13. ábra. A PACAP-38 hatása mustárolajjal, RTX-szel és kapszaicinnal kiváltott akut neurogén bőrgyulladásra (n=6-10; $\text{átlagai} \pm \text{SEM}$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. oldószer).

A PACAP-38 hatása a neurogén fülduzzadásra egérben

A kontroll csoportban az egérfül átmérője 258 ± 15 μm -ről 375 ± 24 μm -re növekedett 3 órával az 1%-os mustárolajjal történő kenés után. A PACAP-38 (10, 100 és 1000 $\mu\text{g/kg}$ i.p.) dózisfüggő módon gátolta a duzzadást, a legmagasabb dózis teljesen kivédte ezt a neurogén gyulladásos választ (**IV/14. ábra**). A teljes kísérleti periódusra vonatkozó duzzadásgörbék alatti területek (area under the curve: AUC) értékelése is alátámasztotta ezt az eredményt. Az AUC a kontroll, oldószerrel kezelt csoportban 654.2 ± 36.5 területegység volt, míg ez az érték a 10, 100 és 1000 $\mu\text{g/kg}$ PACAP-38-kezelés esetében 327.2 ± 23.6 , 174.2 ± 12.3 és 9.5 ± 3.6 egységre csökkent, a különbség mindhárom esetben szignifikáns volt. A szövettani metszeteken is jól látható, hogy a paraffinolajjal kent nem gyulladt fül szerkezetével (**IV/15. A. ábra**) összehasonlítva 3 órával a mustárolaj alkalmazása után jelentős ödémaképződés van a bőr alatti kötőszövetben, de granulociták beáramlása még nem tapasztalható. Az i.p. PACAP-kezelés mikrométerrel meghatározott dózisfüggő duzzadásgátló hatását a szövettani képeken látott eredmények is jól alátámasztják (**IV/15. C., D., E. ábra**).



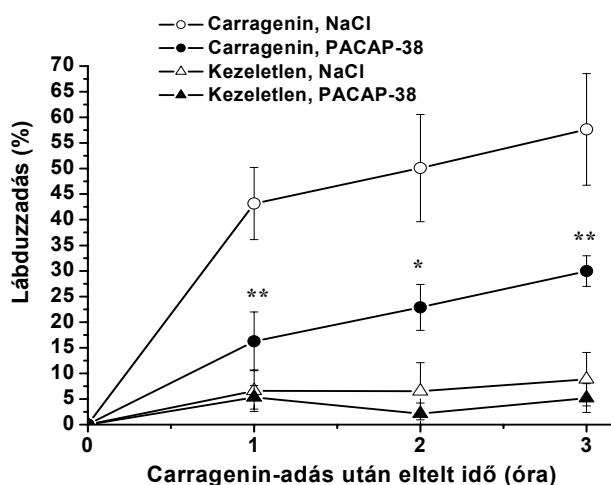
IV/14. ábra. A PACAP-38 hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásra egérben (n=7-12; átlag \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. oldószer).



IV/15. ábra. Egérfül keresztmetszetek szövettani képe. Az (A) ép fül szerkezete, (B) mustárolajjal kent fül képe 3 óra múlva, (C) 10 µg/kg, (D) 100 µg/kg és (E) 1000 µg/kg i.p. PACAP-38-kezelte állatok mustárolajjal kent fülének szerkezete, HE festés, 200x-os nagyítás.

A PACAP-38 hatása carrageninnel kiváltott lábduzzadásra patkányban

Carragenin (100 µl 3%) intraplantáris injekciója 1, 2 és 3 óra múlva 43.2%, 50.1% és 57.6% lábduzzadást okozott kontroll patkányokban. A PACAP-38-előkezelés (100 µg/kg i.p.) után a carrageninnel kiváltott ödéma mindhárom mérési pontban szignifikánsan csökkent (**IV/16. ábra**). Ez a jelentős gátló hatás a lábduzzadás adatok görbe alatti területeinek (AUC) analízisével is látható, amely 65.6 ± 5.1 egység volt az oldószerrel kezelt csoportban és szignifikánsan kisebb, mindössze 39.9 ± 3.2 egység a PACAP-kezelte csoportban ($p=0.003$).



IV/16. ábra. A PACAP-38 hatása a carrageeninnel kiváltott lábduzzadásra (n=6-9 patkány/csoport; átlag±SEM; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. oldószeres csoport).

IV. 4. 3. Fejezet: AZ ENDOMORFIN-1 HATÁSA SZENZOROS NEUROPEPTIDEK FELSZABADULÁSÁRA *IN VITRO* ÉS AKUT GYULLADÁSOS FOLYAMATOKRA *IN VIVO*

Az EM-1 hatása az elektromos téringerléssel kiváltott SP- és CGRP-felszabadulásra

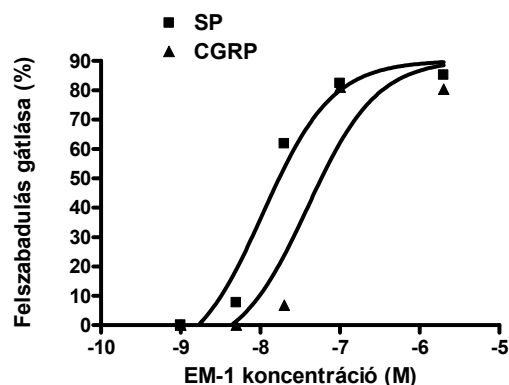
Az EM-1 (5-2000 nM) koncentrációfüggő módon gátolta mindkét gyulladásokeltő szenzoros neuropeptid stimuláció következtében történő felszabadulását, az alap, ingerlés nélküli peptidkiáramlást azonban nem befolyásolta (*IV/1. táblázat*). A szigmoid koncentráció-hatás görbék analízise azt mutatta, hogy az EM-1 maximális gátló hatása 80.4% volt a SP és 85.2% a CGRP esetében. A hatáserősségre utaló EC₅₀ érték 39.48 nM volt a SP és 10.83 nM a CGRP vonatkozásában (*IV/17. ábra*). A μ -opioid receptor antagonistá naloxon 1 μ M a 100 nM EM-1 gátló hatásait mindkét peptid esetében kivédte, önmagában azonban nem volt hatással sem a bazális, sem az ingerléssel kiváltott peptidfelszabadulásra (*IV/1. táblázat*).

Az EM-1 hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásra patkányban

Az EM-1 (1, 10 and 100 μ g/kg, i.p.) dózisfüggően gátolta a mustárolajjal kiváltott plazmafehérje-kiáramlást a lábháti bőrben. A két nagyobb dózis esetén 49.1% és 55.4%-os csökkenést tapasztaltunk. A naloxon-előkezelés (3 mg/kg s.c.) teljesen kivédte a 100 μ g/kg EM-1 gátló hatását, de önmagában nem befolyásolta a gyulladást (*IV/18. ábra*). A szigmoid dózis-hatás görbe analízisével nyert maximális gátlás 58.4%, az ED₅₀ érték 1.13 μ g/kg volt, tehát az EM-1 jelentős hatékonysággal és nagy hatáserősséggel rendelkezik ebben a modellben. A 10 μ g/kg dózis 10 napon keresztül napi 3-szor történő i.p. injekciója a gyulladás kiváltása előtt nem csökkentette a gátló hatást az egyszeri alkalmazáskor tapasztalhoz viszonyítva, az EM-1 tehát nem okoz deszenzibilizációt ebben a kísérleti elrendezésben.

Az EM-1 hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén fülduzzadásra egérben

Az EM-1 (1, 10 and 100 μ g/kg, i.p.) a patkánymodellben tapasztaltakhoz hasonlóan dózisfüggően gátolta a neurogén duzzadást. Az 1 órás mérésnél mindhárom dózis hatása szignifikánsnak bizonyult, a teljes mérési periódus alatt azonban csak a legnagyobb, 100 μ g/kg dózis esetében tapasztaltunk szignifikáns gátlást. A naloxonnal történő előkezelés kivédte a 100 μ g/kg EM-1 ödémagátló hatását, a naloxon önmagában hatástalan volt (*IV/19. ábra*). A maximális gátlás 63.2%, az ED₅₀ érték 1.02 μ g/kg volt ebben a modellben, ami nagyon hasonló a patkánykísérletekben tapasztaltakhoz.



IV/17. ábra. Az EM-1 koncentráció-hatás (peptidfelszabadulás-gátlás) görbék

SP-IR (fmol/mg)

Frakció \ Kezelés	Kezelés			
	Kontroll	EM-1	Naloxon	Naloxon+ EM-1
Ingerlés előtti	2.08±0.22	2.72±0.53	1.94±0.32	2.03±0.21
Ingerelt	4.17±0.85*	3.44±0.62	3.97±0.99	3.98±0.7
Ingerlés utáni	3.45±0.72	2.77±0.46	3.21±0.41	3.53±0.86

CGRP-IR (fmol/mg)

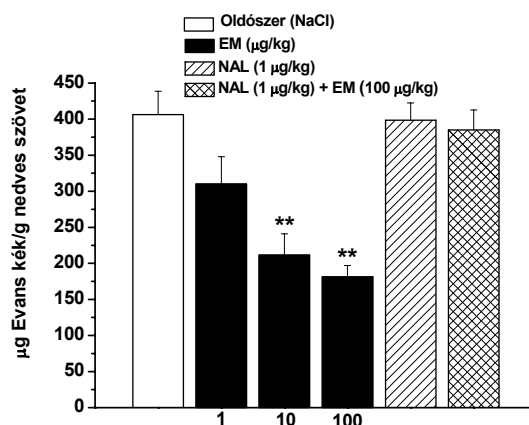
Frakció \ Kezelés	Kezelés			
	Kontroll	EM-1	Naloxon	Naloxon+ EM-1
Ingerlés előtti	0.14±0.01	0.15±0.009	0.11±0.01	0.17±0.03
Ingerelt	0.29±0.02**	0.18±0.009 ^{##}	0.38±0.02	0.40±0.05
Ingerlés utáni	0.21±0.02	0.15±0.008	0.20±0.04	0.23±0.02

IV/1. táblázat. EM-1 (100 nM) hatása a téringerléssel kiváltott SP- és CGRP-felszabadulásra izolált trachea érzőideg-végződéseiből. Az EM-1 hatását az 1 µM naloxon kivédte (n=6; átlag±SEM; *p<0.05, **p<0.01 vs. alapérték; ^{##}p<0.01 vs. kontroll).

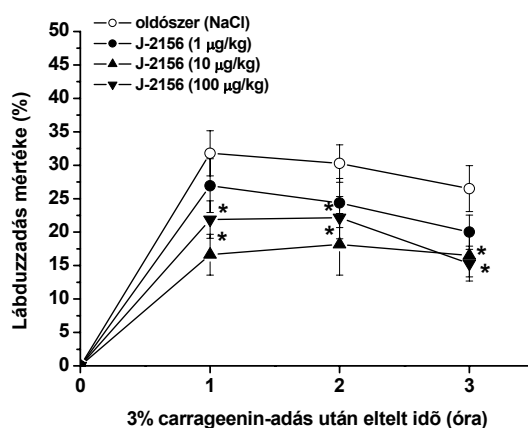
Az EM-1 hatástalansága a mustárolajjal kiváltott késői gyulladásos reakciókra

A mikrométerrel mért adatok és a szövettani metszetek alapján jól látható, hogy a mustárolaj-kenés hatására a fülduzzadás 2-3 óra múlva éri el maximumát, 6 órával a gyulladás kiváltása után már csak kb. 20-30%-os. Ekkorra kialakul a sejtes gyulladásos reakció, erőteljes granulocita-akkumuláció jellemző. Az EM-1 kezelés (100 µg/kg i.p.) az első 3 órában

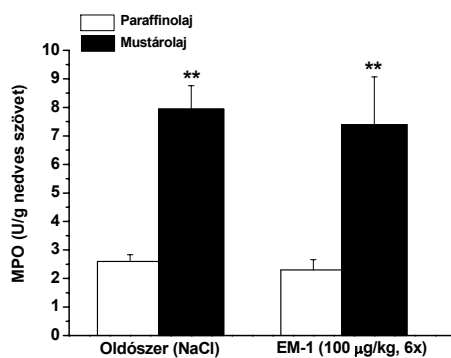
tapasztaltakkal ellentétben nem befolyásolta sem a duzzadást (eredményt nem mutatok), sem a granulocita-akkumulációt ebben a késői időpontban (IV/20. ábra).



IV/18. ábra. Az EM-1 hatása a mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladásra (n=6-9; átlag±SEM; **p<0.01 vs. oldószer).



IV/19. ábra. Az EM-1 hatása a mustárolajjal kiváltott fül-duzzadásra (n=8-12; átlaga±SEM; *p<0.05 vs. oldószer).



IV/20. ábra. Az EM-1 hatása a mustárolajjal kiváltott MPO-aktivitásra egérfülben (n=6-9; átlag±SEM; **p<0.01 vs. paraffinolaj).

IV. 5. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

Ebben a témakörben bemutatott eredményeink gyakorlati jelentőségét hangsúlyozza az a tény, hogy a tachikininek és a CGRP, valamint az általunk közvetített neurogén gyulladásos komponensek számos krónikus gyulladásos betegség, mint pl. az asztma, a reumatoid arthritisz vagy a pszoriázis patomechanizmusában fontos szerepet játszanak. E proinflammatorikus szenzoros neuropeptidek továbbá a neurogén gyulladás közvetítésén kívül mind a periférián, mind a gerincvelőben nagy jelentőséggel bírnak a nociceptív folyamatokban is, elsősorban neuropátiás állapotokban (Helyes et al. 2003, 2009). Jelenleg egyetlen olyan gyulladáscsökkentő gyógyszer sincs, amelyik a neurogén komponenst megbízhatóan tudná gátolni és nem létezik olyan analgetikum, amely közvetlenül az érzőideg-végződéseken hatna (Helyes et al. 2003; Szolcsányi 2004). Bár a kapszaicin-érzékeny afferensek izgatásának következtében kialakuló szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív/antihiperalgetikus hatásokban a belőlük felszabaduló szomatosztatin szerepét több oldalról bizonyítottuk, egyéb gátló hatású szenzoros neuropeptidek hasonló hatásainak felderítése is szükséges.

Az első kísérletsorozatunkban vizsgált szelektív sst₄ receptor agonista J-2156 koncentrációfüggő módon gátolta izolált patkány trachea kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződéseiből az elektromos téringerléssel kiváltott neuropeptid-felszabadulást, valamint *in vivo* körülmények között szignifikánsan gátolta a mustárolajjal előidézett akut neurogén plazmafehérje-kiáramlást. Az *in vitro* eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a neurogén gyulladást csökkentő hatásban szerepet játszik prejunkcionálisan, a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végzésekéből a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidek (SP, CGRP) felszabadulásának gátlása. Több *in vivo* kísérletben, elsősorban a neurogén gyulladásos komponenst is tartalmazó modellben, nem tapasztaltunk dózis-hatás összefüggést. Ennek feltételezhetően az lehet a magyarázata, hogy nagyobb dózisban a J-2156 már gátolja az endogén gyulladásgátló hatású szomatosztatin felszabadulását is a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végzésekéből, a gyulladáskeltő neuropeptidek felszabadulásának gátlása mellett. A mustárolajjal kiváltott akut neurogén gyulladás-modellben patkány lábháti bőrében a natív szomatosztatinnal azonos hatékonyságúnak bizonyult mind per os, mind 6 órás i.p. előkezelés után is. Számos adat utal arra, hogy a mustárolaj 5% alatti koncentrációban szelektíven a kapszaicin-érzékeny idegvégződéseket izgatja a TRPA1 ioncsatorna aktiválásán keresztül (Jordt et al. 2004). Az ugyanezekben a végződésen is megtalálható sst₄ receptor aktivációja a G_i-proteinen keresztül csökkenti a cAMP szintézisét, valamint a protein kináz A aktivitását

(Patel 1999). Ezek mellett a receptor stimulációja megnyitja a K^+ -csatornák és blokkolja a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák működését (Koch et al. 1988). Ezen hatások következménye a neurotranszmitterek felszabadulásának gátlása.

Tekintve, hogy a J-2156 a dextánnal, illetve bradikininnel kiváltott nem-neurogén gyulladást is képes volt gátolni, hatásmechanizmusának egyéb, posztjunkcionális komponensei is vannak, valószínűleg közvetlenül az érfali endothel- és/vagy a gyulladásos sejteken – elsősorban hízósejteken – is gátló hatást fejt ki. Hemodinamikai vizsgálataink során a J-2156 még 100 $\mu\text{g/kg}$ dózisban sem befolyásolta patkány artériás vérnyomását, illetve szívfrekvenciáját (adatokat erre vonatkozóan nem mutattam). Az $ss4$ receptor szelektivitásából adódóan endokrin hatásokkal feltehetően nem rendelkezik. Korábbi vizsgálatainkban a heptapeptid szomatosztatin analóg TT-232 a J-2156-hoz hasonlóan hatékonyan gátolta *in vitro* a szenzoros neuropeptidok felszabadulását és *in vivo* az akut neurogén és nem-neurogén gyulladásos folyamatokat patkányban és egérben egyaránt. Minimális effektív dózisa 10 $\mu\text{g/kg}$ volt i.p. a mustárolajjal kiváltott neurogén, valamint a dextánnal, illetve bradikininnel kiváltott nem-neurogén akut gyulladásmodellekben (Helyes et al. 2001; Pintér et al. 2002; Helyes et al. 2005). Receptor-kötési próbákkal kimutatták, hogy a J-2156 nagyságrendekkel nagyobb affinitással kötődik az $ss4$ receptorokhoz, mint a TT-232 (K_d értékek: 1.2 ± 0.4 nM vs. 200 ± 10 nM). A TT-232 továbbá számottevő mértékben kötődik az $ss1$ receptorokhoz is (K_d : 1300 ± 400 nM; Helyes et al. 2005). Összehasonlítva a két vegyület hatását, azt állapíthatjuk meg, hogy a TT-232 hatáserőssége kb. tízszer kisebb volt, mint a J-2156-é az általunk vizsgált akut gyulladásmodellekben, hatékonysága azonban több esetben nagyobb. A maximális gátló hatás a mustárolajjal kiváltott akut plazmaprotein extravazációra 64%, dextránnal kiváltott nem-neurogén lábduzzadásra 52%, a bradikininnel kiváltott nem-neurogén plazmaprotein extravazációra 32% (Pintér et al. 2002). Ugyanezen értékek a J-2156 esetében 39%, 30% és 42% voltak. E különbségek magyarázata valószínűleg az, hogy a TT-232 gyulladásgátló hatásainak közvetítésében az $ss4$ receptorokon kívül a $ss1$ receptorok, illetve a TT-232 tirozin-kináz gátló hatása (Kéri et al. 1993, 1996) is szerepet játszik. Bár farmakokinetikai jellemzőket nem vizsgáltunk, e két vegyület *in vivo* hatásai közti eltérések háttérben kinetikai különbségek is elképzelhetők. A J-2156 legnagyobb előnyei a TT-232-vel szemben kétségtelenül az, hogy nem-peptid szerkezetű, ezért orálisan is alkalmazható. Az $ss4$ receptor-stimuláció más típusú, gyulladásos sejteken kifejtett antiinflammatorikus hatását az izolált peritoneális makrofág tenyésztésben bizonyítottuk. A J-2156 szignifikánsan gátolta a stimulált peritoneális makrofágok IL-1 β -termelését, a maximális gátló hatás 50-70% volt, koncentráció-hatás összefüggést azonban ebben a kísérleti

elrendezésben sem tudtunk kimutatni. Ez a sokféle sejt által termelt gyulladásokkeltő citokin jelentős szerepet játszik számos (pl. légúti és ízületi) gyulladásos folyamat kialakulásában. Az I. témakörben bemutattam, hogy az *in vivo* J-2156-kezelés csökkenti az intranazális endotoxin hatására bekövetkező IL-1 β -emelkedést a tüdőben, jelen eredmények alapján ennek mechanizmusa közvetlenül az sst₄ receptort expresszáló gyulladásos sejteken történő gátló hatás.

Alap- és alkalmazott kutatásunk fő iránya egyértelműen az sst₄ receptor agonistákban rejlő gyógyszerfejlesztési perspektívák felderítése, emellett azonban a neurogén gyulladást, neuropátiás fájdalmat potenciálisan gátló egyéb célmolekulák vizsgálata is érdekes.

Bár a PACAP jelenlétét kimutatták a kapszaicin-érzékeny neuronokban (Moller et al. 1993; Mulder et al. 1994), a mi eredményeink az elsők arra vonatkozóan, hogy a PACAP-38 felszabadul patkányban a légúti afferensekből mind alacsony koncentrációjú (10⁻⁶ M) kapszaicin, mind elektromos téringerlés hatására. Azt is bizonyítottuk továbbá, hogy a kapszaicin-érzékeny rostok szisztémás *in vivo* stimulációja következtében a PACAP-38 koncentrációja szignifikánsan megemelkedik a keringésben. A PACAP más szenzoros neuropeptidok felszabadulását gátló hatásának leírását ugyancsak úttörő eredménynek tekinthetjük. Az izolált trachea preparátumon nyert adataink közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a PACAP-38 (2-2000 nM) koncentrációfüggő módon csökkenti a SP, CGRP és SOM kiáramlását, a maximális gátlás 70-90%. Ez a hatás annál is inkább jelentős, mert ugyanebben az *in vitro* modellben a TT-232, a J-2156 vagy az opioid nociceptin maximális gátló hatása 45-65%-os (Helyes et al. 1997; Helyes et al. 2001), tehát a PACAP hatékonysága nagyobb. A PACAP-38 EC₅₀ értéke 20-90 nM között volt, ami az sst₄ agonisták hatáserejéhez hasonló (Helyes et al. 1997; Helyes et al. 2001). Az általunk bizonyított SP- és CGRP-felszabadulást gátló mechanizmus jól magyarázza azokat az adatokat, hogy a PACAP a trachea és a bronchusok területén simaizom-relaxációt okoz (Foda et al. 1995; Shigyo et al. 1998), gátolja a nyáktermelést és a plazmafehérje-kiáramlást (Shigyo et al. 1998). Mivel a SP és a CGRP a neurogén gyulladás fő mediátorai, következő lépésben *in vivo* kizárólag neurogén mechanizmusokkal kialakuló gyulladásmodellekben vizsgáltuk a PACAP-38 hatásait. A mustárolaj szelektíven a TRPA1, míg az RTX és a kapszaicin a TRPV1 ioncsatornák aktivációjával hoz létre neuropeptid-felszabadulást. Szisztémás adás után a PACAP-38 szignifikánsan gátolta a mustárolajjal kiváltott akut fülduzzadást egérben és a plazmafehérje-kiáramlást patkányban. A 100 μ g/kg i.p. PACAP egérben teljesen kivédte a fülduzzadást és patkány lábhati bőrén is szignifikánsan csökkentette a plazmafehérje-kiáramlást. Patkányban hasonlóképpen gátolta az RTX-szel és kapszaicinnal indukált

neurogén Evans kék akkumulációt, valamint a carrageninnel kiváltott akut lábduzzadást is, amelyben neurogén és nem-neurogén komponensek egyaránt szerepet játszanak. Arra is vannak adatok, hogy lokálisan alkalmazott PACAP gyulladáskeltő hatásokat, értágulatot és plazmafehérje-kiáramlást okoz nyúl szemben (Wang et al. 1997). Intradermális PACAP-injekció hasonló akut gyulladásos válaszokat okozott patkány és nyúl bőrében (Warren et al. 1993; Cardell et al. 1997). Lokális adás után ez a közvetett, hízósejt-degranulációt és hisztamin-felszabadítást okozó hatás valószínűleg nem receptor-mediált nem-specifikus mechanizmus, hasonló hatásokat számos más peptidre, pl. a szomatosztatinra, is leírtak. Összefoglalva tehát, jelen eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy a PACAP-38 felszabadul a stimulált kapszaicin-érzékeny afferensekből és gátolja más neuropeptidek kiáramlását. Ezen keresztül szisztémás alkalmazás után *in vivo* képes jelentősen csökkenteni/kivédeni a neurogén gyulladást. Ezek a gátló mechanizmusok részben megmagyarázzák a PACAP-38 előző témakörben bemutatott perifériás antinociceptív hatásait. Ott is rámutattam arra a látszólagos ellentmondásra, hogy a megfigyelt gátló hatások nem következhetnek a PACAP ismert receptorainak aktivációja következtében létrejövő szignáltranszdukciós folyamatokkal. Mind a PAC₁, mind a VPAC_{1/2} receptorokra G_s- és G_q-proteinhez kapcsolt mechanizmusokat írtak le, ami fokozott adenilát cikláz-aktivitást és növekvő cAMP-szintet, illetve növekvő intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt eredményez (Vaudry et al. 2000; Laburthe et al. 2007; Taiwo és Levine 1991; Taiwo et al. 1992; Spengler et al. 1993). Mindkét folyamat neuronális aktivációhoz, és nem az általunk tapasztalt gátláshoz vezet. Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a gátlás nem közvetlenül az idegvégződésen, hanem más sejtekből történő gátló mediátor felszabadításán keresztül jön létre, de lehetséges eddig még nem azonosított gátló mechanizmus, esetleg egy PACAP-al aktiválható gátló receptor/ioncsatorna létezése a perifériás érzőideg-végződéseken.

A harmadik fejezetben bemutatott eredményeink elsőként igazolták, hogy az endogén μ -opioid receptor agonista endomorfín-1 (5-2000 nM) a szomatosztatinhoz/sst₄ agonistákhoz és a PACAP-hoz hasonlóan ugyancsak képes szignifikánsan, koncentrációfüggő módon csökkenteni a szenzoros neuropeptidek felszabadulását a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből. A maximális gátló hatás a SP és a CGRP estében is 80-85%, az EC₅₀ érték pedig nagyon alacsony, nanomólos koncentrációtartományban volt. Az EM-1 100 nM koncentrációja 80.1% gátlást fejtett ki a SP- és 82.3% a CGRP-felszabadulásra, míg ugyanez a nociceptin koncentráció csak 63.1% és 44.1% csökkenést eredményezett (Helyes et al. 1997), az EM-1 tehát a nociceptinnél hatékonyabbnak bizonyult. Az EM-1 akut neurogén gyulladást gátló hatásait patkányban és egerben ugyancsak sikerült igazolnunk *in vivo*.

Érdeemes kihangsúlyozni, hogy 10 napig történő ismételt adás után sem csökkent ez hatás az egyszeri alkalmazáskor tapasztalttal összehasonlítva, tehát ebben a modellben az EM-1 tartós alkalmazása nem okoz toleranciát. Mindkét fajban a mustárolajjal kiváltott neurogén gyulladást gátló hatás maximuma 55-60%, az ED₅₀ megközelítőleg az 1 µg/kg i.p. dózis volt. Az EM-1 gyulladásgátló hatásában feltételezett prejunkcionális mechanizmusokra (Khalil et al. 1999) eredményeink egyértelmű, közvetlen bizonyítékokat szolgáltatnak. Mivel a naloxon mindhárom modellben kivédte az EM-1 gátló hatásait, e tetrapeptid ismert µ-opioid receptor agonista hatása (Fischer és Undem 1999; Patel 1999; Lippl et al. 2001; Fichna et al. 2007) jól magyarázza eredményeinket, más, nem specifikus mechanizmusok nem játszanak benne szerepet. Korábbi adataink alapján ismert, hogy a mustárolaj az alkalmazását követően 6 órával granulociták beáramlását is kiváltja, ebben a késői gyulladáshoz azonban nem-neurogén, szenzoros neuropeptidektől független mechanizmusok játszanak szerepet (Bánvölgyi et al. 2004). Az EM-1 hatékony ödémagátló hatásával ellentétben nem csökkentette a mustárolajjal kiváltott gyulladás késői, sejtes fázisát, a granulocitákra tehát nincs hatása. Számos mechanizmust részletesen leírtak, amelyekkel perifériás gyulladásos körülmények között az opioidok hatásai fokozódnak. A primér szenzoros neuronok perifériás végződéseiben az opioid receptorok száma megnövekszik (Zhang et al. 1998; Pol és Puig 2004), fokozódik az opioid receptorok G-protein aktiváló képessége, amely csökkenő intracelluláris cAMP-koncentrációhoz vezet (Zöllner et al. 2003) és fokozódik az opioid peptidek felszabadulása a gyulladt területre beáramló gyulladásos és immunsejtekből (Stein et al. 1990; Stein et al. 2001; Machelska et al. 2002; Mousa et al. 2002). A gyulladásos stimulusok serkentik a µ-opioid receptorok szintézisét a primér szenzoros neuronok sejttestjeiben a hátsó gyöki ganglionokban, valamint fokozódik e receptorok perifériás végződés felé történő axonális transzportja (Stein et al. 1990; Cain et al. 1997; Stein et al. 2001; Mousa et al. 2002; Nagakura et al. 2003; Puehler et al. 2004). E folyamatok következtében megnövekedik a µ-opioid receptorok expressziója a perifériás érzőideg-végződéseken, ami jelentős szerepet játszik a gyulladásos körülmények között nagy mennyiségben -elsősorban a leukocitákból felszabaduló opioid peptidek fokozott endogén analgetikus és gyulladásgátló hatásaiban, de az exogén opioid receptor agonisták terápiás hatásaiban is (Mousa et al. 2002; Ballet et al. 2003; Puehler et al. 2004; Shaqura et al. 2004). A µ-opioid receptorok perifériás idegvégződéseken történő stimulációja tehát ugyancsak ígéretes új perspektívákat jelenthet a neurogén gyulladás gátlására tolerancia kialakulásának veszélye nélkül.

IV. 6. A TÉMAKÖRBEN BEMUTATOTT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. *In vitro* és *in vivo* bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a szelektív sst₄ receptor agonista J-2156 jelentősen gátolja a gyulladásos folyamatok neurogén és nem-neurogén (vaszkuláris és sejtes) komponensét egyaránt. Az előbbi –legalábbis részben- a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből a gyulladáskeltő szenzoros neuropeptidek (P-anyag, CGRP) felszabadulásának gátlása következtében jön létre, de az érfali endothelsejteken kifejtett közvetlen gátló hatás is lehetséges. Ez utóbbi mechanizmus szerepet játszik a nem-neurogén gyulladást gátló hatásban is, amelyben még a gyulladásos sejtekből történő gyulladáskeltő citokinek és egyéb mediátorok felszabadulásának csökkentése is nagy jelentőséggel bír.

2. Elsőként bizonyítottuk *in vitro* és *in vivo* kísérleti elrendezésekben egyaránt, hogy a PACAP-38 felszabadul a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekből. Ezeknek az afferensek testszerte történő stimulációja következtében a PACAP-38 koncentrációja szignifikánsan megemelkedik a szisztémás keringésben. A PACAP-38 –a szomatosztatinhoz hasonlóan- gátolja az akut gyulladásos folyamatok neurogén és nem-neurogén komponenseit egyaránt patkány- és egérmodellekben.

3. Az endogén opioid peptid, az endomorfín-1, ugyancsak képes szignifikánsan csökkenteni a szenzoros neuropeptidek kapszaicin-érzékeny afferensekből történő felszabadulását és a neurogén mechanizmussal létrejövő akut plazmafehérje-kiáramlást. Ezzel szemben azonban a a mustárolajjal kiváltott gyulladásos folyamat késői, nem-neurogén vaszkuláris és sejtes komponenseire nincs hatása.

4. Bizonyítottuk, hogy a kapszaicin-érzékeny afferensek izgatásának következtében kialakuló szisztémás gyulladásgátló és antinociceptív/antihiperalgetikus hatásokban a belőlük felszabaduló szomatosztatin fontos mediátor. A szomatosztatin mellett azonban e rostokban lévő egyéb gátló hatású szenzoros neuropeptidek is, mint a PACAP-38 vagy az EM-1, szerepet játszhatnak e folyamatokban, ezért vizsgálatuk ugyancsak érdekes. Bár kutatásaink központjában kétségtávol a szomatosztatin gyulladásgátló és analgetikus hatásainak feltérképezése és az ebben rejlő új gyógyszerfejlesztési perspektívák kihasználása áll, ezzel párhuzamosan egyéb potenciális célmolekulák azonosításával is próbálkozunk.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK, JÖVŐBELI KUTATÁSI IRÁNYOK

Ebben a fejezetben szeretném röviden összegezni az értekezésben bemutatott legfontosabb tudományos felismeréseket, kihangsúlyozni eredményeink alapkutatási és potenciális gyógyszerfejlesztési jelentőségeit és felvázolni a téma folytatásának fő irányait.

Légúti és ízületi gyulladásos folyamatok, valamint különféle fájdalommal járó állapotok állatkísérletes modelljeiben számos bizonyítékot szolgáltatunk a kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződésekből felszabaduló szomatosztatin gátló hatásaira. Ezt az elsőként általunk leírt ellenregulációs mechanizmust és ennek patofiziológiai jelentőségét funkcionális mérésekkel, kémiai, morfológiai, és immunológiai módszerekkel több irányból is megerősítettük. Igazoltuk továbbá, hogy a szenzoros rostokból gyulladásos stimuláció hatására a szisztémás keringésbe jutó szomatosztatin gyulladásgátló és analgetikus hatásait az öt receptora közül elsősorban az sst₄ és sst₁ receptorok aktivációjával fejtik ki. Eredményeink alapvetően új mechanizmusú gyulladásgátló és analgetikus hatású gyógyszercsoport kifejlesztésére jelentenek megbízható alapkísérletes kiindulópontot. Bár a natív szomatosztatin nagyon rövid plazma eliminációs féleletideje és az sst₂/sst₃/sst₅ receptorok aktivációjából adódó, elsősorban endokrin mellékhatásai miatt nem lehet ideális gyógyszerjelölt, szintetikus, stabil, szelektív sst₄/sst₁ agonisták áttörést jelenthetnének a gyulladáscsökkentő/fájdalomcsillapító gyógyszerek terén.

Bizonyítottuk azt is, hogy elsősorban a kapszaicin-érzékeny idegvégződéseken lokalizálódó TRPV1 receptor fontos szabályozó molekula, aktivációja a gyulladás és fájdalom fokozódásához és gátlásához egyaránt vezethet a patofiziológiai folyamat mechanizmusától függően. Légúti gyulladásban és krónikus polineuropátia állapotokban ez a nem-szelektív kationcsatorna protektív szerepet játszik a stimulációja következtében felszabaduló szomatosztatin közvetítésével. Ezzel szemben krónikus ízületi gyulladásban a TRPV1 aktiváció fokozza a gyulladásos folyamatokat és a következményes hiperalgéziát. Az ízületi afferensekből a szomatosztatin felszabadulása elsősorban nem TRPV1 receptor mediálta folyamat. Ezen a területen TRPV1 csatorna stimulációja következtében valószínűleg a tachikinineknek és CGRP lokális felszabadulása dominál és ez játszik döntő szerepet a gyulladásos és fájdalomfolyamatok fokozódásában. TRPV1 receptor antagonisták új analgetikum-csoport irányába történő fejlesztésére az utóbbi évtizedben több nagy nemzetközi

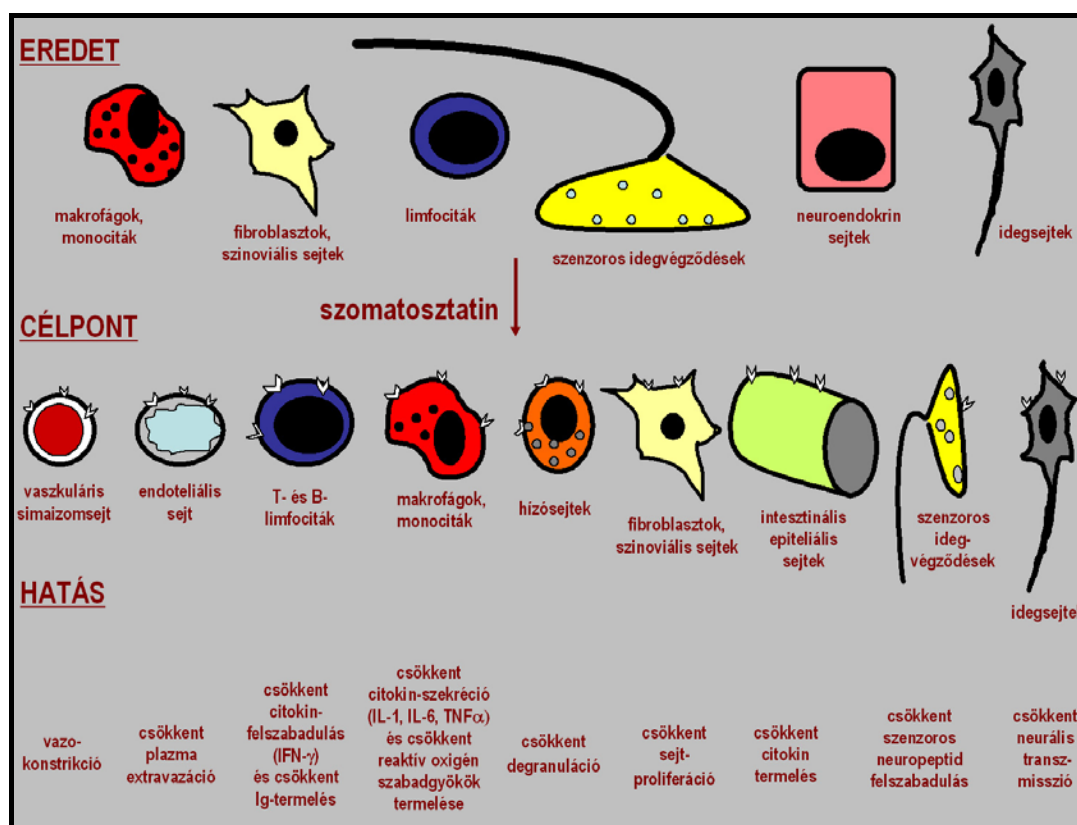
gyógyszergyár is projekteket indított (Szołcányi 2008; Gunthorpe és Chizh 2009), ami azért is különösen fontos, mert közvetlenül az érzőideg-végződéseken ható fájdalomcsillapítók nem állnak rendelkezésre. Eredményeink alapján ezek a vegyületek valóban hatékonyak lehetnek bizonyos akut vagy krónikus gyulladásos fájdalom, illetve artritisz kezelésében, a krónikus polineuropátiát, légúti gyulladást, kontakt dermatitist azonban súlyosbíthatják.

Modell	TRPV1 receptor szerepe	Referencia
Kapszaicinnel kiváltott fülduzzadás	Kizárólagos fontosságú	
Forbolészterrel, illetve vanilloidokkal kiváltott akut nocifenzív reakció	Kizárólagos fontosságú	<i>Bölcskei et al. 2005</i> <i>Caterina et al. 2000</i>
Carrageninnel, ill. adjuvánssal kiváltott akut gyulladás	Termális hiperalgéziában kizárólagos fontosságú; alap hő- és mechanikai küszöböt nem befolyásolja	<i>Davis et al. 2000</i> <i>Caterina et al. 2000</i>
Mustárolajjal-indukált fülduzzadás	Nincs szignifikáns szerepe	<i>Bánvölgyi et al. 2004</i>
Carrageninnel és formalinnal kiváltott gyulladás, traumás mononeuropátia	A nocifenzív reakcióban és a mechanikai hiperalgéziában nincs szerepe	<i>Bölcskei et al. 2005</i>
Kapszaicinnel kiváltott vazokonstriktio térdízületben	Jelentősen fokoz	<i>Keeble és Brain 2006</i>
Adjuváns artritisz	Gyulladást és mechanikai hiperalgéziát fokozó	<i>Szabó et al. 2005</i> <i>Barton et al. 2006</i>
Intranazális endotoxinnal kiváltott pneumonitisz	Gyulladást és légúti hiperreaktivitást gátló	<i>Helges et al. 2007</i>
Oxazolonnal kiváltott késői típusú hiperszenzitív reakció a bőrben	Gyulladásos reakciót gátló	<i>Bánvölgyi et al. 2004</i>
Bleomicinnel kiváltott szkleroderma	Gyulladást és fibrózist gátló	<i>Szabó et al. 2008</i>
Diabéteszes és toxikus polineuropátia	Mechanikai hiperalgéziát gátló	<i>Bölcskei et al. 2005</i>
Endotoxinnal (i.p.) kiváltott szepszis	Protektív, szeptikus paraméterek csökkentése	<i>Clark et al. 2007</i>

A TRPV1 receptor egér gyulladás- és nocicepció modellekben betöltött szerepének összefoglalása
(a vastagon jelölt referenciák saját közleményeink, az aláhúzottak értekezésem alapját képezik)

Ez utóbbi esetben csak az sst₄/sst₁ agonisták jelenthetnek új terápiás perspektívákat. A mi eredményeink és közleményeink alapján velünk együttműködve több hazai (Biostatin Kft.; Richter-Gedeon Ltd.) és külföldi (a kanadai Thallion; a svédországi Inovacia) gyógyszergyár

és biotechnológiai vállalat elindította sst₄ agonisták fejlesztését. Ezek a vegyületek légúti és ízületi gyulladásban, valamint akut és krónikus fájdalomállapotokban egyaránt ígéretesek lehetnek a több célponton kialakuló gátló hatásnak köszönhetően. Morfológiai adataink a funkcionális eredményeinkkel együtt arra utalnak, hogy az sst₄ agonisták gyulladásgátló hatásainak hátterében komplex neurogén és sejtjes mechanizmusok állnak. A perifériás érzőideg-végződéseken lévő sst₄/sst₁ stimuláció csökkenti az afferens aktivitást és a fájdalom- és gyulladáskeltő szenzoros neuropeptid felszabadulását. E prejunkcionális mechanizmuson kívül az endothelsejteken és az immunsejteken történő közvetlen hatás is szerepet játszik a gyulladáscsökkentő hatásban a plazmafehérje-kiáramlás gátlásán, a hízósejt-degranuláció és a gyulladáskeltő citokinek termelésének csökkentésén keresztül. A bronchiális simaizmon lévő sst₄/sst₁ receptorok stimulációja gátolja a légúti hiperreaktivitást is (Pintér et al. 2006).



A szomatosztatin gyulladásgátló és fájdalomcsillapító hatásai hátterében álló mechanizmusok

A TT-232-vel néhány éve egyetemünk klinikai farmakológiai vizsgálóhelyén sikerrel lezárultak a fázis I/A és I/B vizsgálatok, melyek során egészséges önkéntesekben számottevő mellékhatásokat nem tapasztaltak. A fázis II. vizsgálatot Kanadában végzik majd a közeljövőben. A Biostatin Kft.-vel és az MTA Peptidbiokémiai Kutatócsoportjával együttműködve a Pázmány Péter Regionális Egyetemi Tudásközpont keretein belül számos nem-peptid, illetve stabil, orálisan is aktív ciklikus kis peptid követő molekula állatkísérletes

vizsgálatát elvégeztük, a vegyületcsoportokat közösen szabadalmaztattuk. A leghatékonyabb molekulák kiválasztása, ezek további hatástani vizsgálata, preklinikai dossziék összeállítása és klinikai fejlesztése az elkövetkezendő néhány év legfontosabb feladatát jelentik.

A gyógyszerfejlesztési vonal mellett az sst₄ receptor lokalizációjának, gyulladásos körülmények között történő expressziós változásainak felderítését szeretnénk folytatni elsősorban emberi szövetmintákon klinikai és patológiai kollaborációk segítségével. E vizsgálatok megmutatják, hogy az állatkísérletes eredményeink extrapolálhatók-e emberi patofiziológiai folyamatokra. Első ilyen irányú lépésként mRNS és fehérje szinten is bizonyítottuk az sst₄ receptor jelenlétét egér és emberi tüdőben. Az expressziós mintázatban meglepő hasonlóságot találtunk, e receptor mindkét fajban a bronchiális/bronchioláris epithelsejteken, a vaszkuláris endothelsejteken, a hörgő- és érfali simaizomsejteken és szeptális fibrocitákon lokalizálódik. Gyulladásos folyamatok hatására beáramló és aktiválódó makrofágok és limfociták jelentős sst₄ expresszió-fokozódást okoznak.

Terveink a közeljövőben az sst₄ és TRPV1 receptorok meghatározására és gyulladásos körülmények között történő expressziós változásainak vizsgálatára irányulnak egér arthritisz modellekben, valamint emberi ízületi tokban és szinoviális szövetben (műtétek során eltávolított mintákból). Ezeket a vizsgálatokat azért tartom különösen fontosnak, mert az eredmények lehetővé teszik az egérmodellekben nyert adatok emberi kórfolyamatokra történő extrapolálását. Az Ortopédiai Klinikával és az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézettel együttműködve a mintavételeket megterveztük, az etikai bizottsági engedélyt már megkaptuk. Mivel számos adat bizonyítja, hogy a szenzoros neuropeptidek gyulladásos bélbetegségekben is fontos szerepet játszanak, ezek kísérletes modelljeinek beállítását is elkezdjük. Ezzel párhuzamosan immunhisztokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokat szeretnénk végezni bélbiopsziás mintákból az I. sz. Belgyógyászati Klinikával kollaborációban.

Több újabb eredmény is igazolja a TRPV1 receptor nem-neuronális lokalizációját keratinocitákon, epithelsejteken és urotheliumon (Gunthorpe és Szállási 2008). Erre vonatkozóan is tervezünk vizsgálatokat a tüdőben, az ízületben és a bélben, hogy az érzőidegvégződéseken található TRPV1-től elkülönítsük és gyulladásban betöltött szerepét felderítsük. Állatkísérletes légzésfunkció-vizsgáló laboratóriumunkba OTKA támogatás segítségével néhány hónapja beszereztünk egy kisállat-dohányoztató készüléket, amellyel krónikus bronchitisz és emfizéma állatkísérletes modelljeit szeretnénk beállítani, kidolgozni. További terveink között szerepel ezeknek az eltérő mechanizmusú krónikus légúti gyulladásos folyamatoknak a vizsgálata, a kapszaicin-érzékeny afferensek és szenzoros neuropeptidek szerepének felderítése, és esetleg új gyógyszercélpontok keresése.

IRODALOMJEGYZÉK

- Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP, Delgado M (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits collagen-induced arthritis: an experimental immunomodulatory therapy. *J. Immunol.* 167: 3182-3189.
- Abad C, Gomariz RP, Waschek JA (2006). Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 151-163.
- Advenier C, Lagente V, Boichot E (1997). The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. *Eur. Respir. J.* 10: 1892-1906.
- Ahluwalia A, De Felipe C, O'Brien J, Hunt SP, Perretti M (1998). Impaired IL-1 β -induced neutrophil accumulation in tachykinin NK1 receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1013-1015.
- Ahmed M, Bjurholm A, Schultzberg M, Theodorsson E, Kreicbergs A (1995a). Increased levels of substance P and CGRP in rat adjuvant arthritis. A combined immunohistochemical radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum.* 38: 699-709.
- Ahmed M, Bjurholm A, Srinivasan GR (1995b). Capsaicin effects on substance P and CGRP in rat adjuvant arthritis. *Regul. Pept.* 55: 85-102.
- Ahmed M, Srinivasan GR, Theodorsson E, Schultzberg M, Kreicbergs A (1995c). Effects of surgical denervation on substance P and calcitonin gene-related peptide in adjuvant arthritis. *Peptides* 16: 569-579.
- Almási R, Pethő G, Bölcskei K, Szolcsányi J (2003). Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a novel heat allodynia model sensitive to analgesics. *Br. J. Pharmacol.* 139: 49-58.
- Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298: 240-244.
- Arimura A, Somogyvári-Vígh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991). Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789.
- Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F (2003). An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. *Exp. Neurol.* 182: 12-20.
- Ballet S, Conrath M, Fischer J, Kaneko T, Hamon T, Cesselin F (2003). Expression and G-protein coupling of mu-opioid receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia of polyarthritic rats. *Neuropeptides* 37: 211-219.
- Baluk P, Thurston G, Murphy TJ, Bunnett NW, McDonald DM (1999). Neurogenic plasma leakage in mouse airways. *Br. J. Pharmacol.* 126: 522-528.
- Barin AK, McDougall JJ (2003). Endomorphin-1 causes synovial hypoaemia in rat knee joints via a capsaicin-sensitive neural pathway. *Neurosci. Lett.* 344: 21-24.
- Barnes PJ (1990). Neurogenic inflammation in airways and its modulation. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 303: 67-82.
- Barnes PJ (2001). Potential novel therapies for chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Found. Symp.* 234: 255-267.
- Barthó L, Szolcsányi J (1981). Opiate agonists inhibit neurogenic plasma extravasation in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 73: 101-104.
- Barton NJ, McQueen DS, Thomson D, Gaudie SD, Wilson AW, Salter DM, Chessell IP (2006). Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. *Exp. Mol. Pathol.* 81: 166-170.
- Bánvölgyi Á, Pozsgai G, Brain SD, Helyes Zs, Szolcsányi J, Ghosh M, Melegh B, Pintér E (2004). Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice. *Neuroscience* 125: 449-459.
- Belvisi MG (2003). Sensory nerves and airway inflammation: role of A delta and C-fibres. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 16: 1-7.
- Bennett GJ (1993). An animal model of neuropathic pain: a review. *Muscle Nerve* 16: 1040-1048.
- Betoin F, Ardid D, Herbet A, Aumaitre O, Kemeny JL, Duchene-Marullaz P, Lavarenne J, Eschalier A (1994). Evidence for a central long-lasting antinociceptive effect of vapreotide, an analog of somatostatin, involving an opioidergic mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 7-14.
- Bevan S, Szolcsányi J (1990). Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 330-333.
- Bileviciute I, Lundberg T, Ekblom A, Theodorsson E (1993). Bilateral changes of substance P-, neurokinin A-, calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. *Neurosci. Lett.* 153: 37-44.
- Billiau A, Matthys P (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 70: 849-860.
- Bingham CO (2008). Emerging therapeutics for rheumatoid arthritis. *Bull. NY Hosp. Jt. Disp.* 66(3): 210-215.
- Birmingham AT, Wilson AB (1963). Preganglionic and postganglionic stimulation of the guinea pig isolated vas deferens preparation. *Br. J. Pharmacol.* 21: 569-580.

- Bloom SR, Polak JM (1985). Regulatory peptides and the lung. *Pediatr. Pulmonol.* 1: S30-S36.
- Blumberg PM (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhodes memorial award lecture. *Cancer Res.* 48: 1-8.
- Bowden JJ, Baluk P, Lefevre PM, Schoeb TR, Lindsey JR, McDonald DM (1996). Sensory denervation by neonatal capsaicin treatment exacerbates *Mycoplasma pulmonis* infection in rat airways. *Am. J. Physiol.* 270: L393-L403.
- Bölskei K, Helyes Zs, Szabó Á, Sándor K, Pethő G, Elekes K, Almási R, Pintér E, Szolcsányi J (2005). Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 117: 368-376.
- Bölskei K, Horváth D, Szolcsányi J, Pethő G (2007). Heat injury-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath: a novel rat thermal hyperalgesia model. *Eur. J. Pharmacol.* 564: 80-87.
- Brazeau P (1986). Somatostatin: a peptide with unexpected physiologic activities. *Am. J. Med.* 81: 8-13.
- Bryant HU, Bernton EW, Holaday JW (1990). Immunomodulatory effects of chronic morphine treatment: pharmacologic and mechanistic studies. *NIDA Res. Monogr.* 96: 131-149.
- Burgess JR, Shepherd JJ, Murton FJ, Parameswaran V, Greenaway TM (1996). Effective control of bone pain by octreotide in a patient with metastatic gastrinoma. *Med. J. Aust.* 164: 725-727.
- Cain CK, Francis JM, Plone MA, Emerich DF, Lindner MD (1997). Pain-related disability and effects of chronic morphine in the adjuvant-induced arthritis model of chronic pain. *Physiol. Behav.* 62: 199-205.
- Cardell LO, Stjarne P, Wagstaff SJ, Augusti C, Nadel JA (1997). PACAP-induced plasma extravasation in rat skin. *Regul. Pept.* 71: 67-71.
- Cao T, Gerard NP, Brain SD (1999). Use of NK1 knockout mice to analyze substance P-induced edema formation. *Am. J. Physiol.* 277: 476-481.
- Cao T, Pintér E, Al-Rashed S, Gerard NP, Hoult R, Brain S (2000). Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J. Immunol.* 164: 5424-5429.
- Carlton SM, Du J, Davidson E, Zhou S, Coggeshall RE (2001a). Somatostatin receptors on peripheral primary afferent terminals: inhibition of sensitized nociceptors. *Pain* 90: 233-244.
- Carlton SM, Du J, Zhou S, Coggeshall RE (2001b). Tonic control of peripheral cutaneous nociceptors by somatostatin receptors. *J. Neurosci.* 21: 4042-4049.
- Carlton SM, Zhou S, Kraemer B, Coggeshall RE (2003). A role for peripheral somatostatin receptors in counter-irritation-induced analgesia. *Neuroscience* 120: 499-508.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313.
- Cesare P, McNaughton P (1996). A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 15435-15439.
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA (1999). Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 23: 617-624.
- Chignard M, Balloy V (2000). Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L1083-L1090.
- Choleris E, Del Seppia C, Thomas AW, Luschi P, Ghione S, Moran GR, Prato FS (2002). Shielding, but not zeroing of the ambient magnetic field reduces stress-induced analgesia in mice. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 269: 193-201.
- Chrubasik J (1991). Somatostatin and chronic pain management. In: Contemporary issues in chronic pain management (ed: Parris WCV), pp. 87-96.
- Chrubasik J, Meynadier J, Blond S, Scherpereel P, Ackerman E, Weinstock M, Bonath K, Cramer H, Wunsch E (1984). Somatostatin, a potent analgesic. *Lancet* 2: 1208-1209.
- Chrubasik J, Meynadier J, Scherpereel P, Wunsch E (1985). The effect of epidural somatostatin on postoperative pain. *Anesth. Analg.* 64: 1085-1088.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-962.
- Clark N, Keeble J, Fernandes ES, Starr A, Liang L, Sugden D, de Winter P, Brain SD (2007). The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin. *FASEB J.* 21: 3747-3755.
- Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM (1997). Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res.* 764: 126-132.

- Colasurdo GN, Loader JE, Graves JP, Larsen GL (1995). Modulation of acetylcholine release in rabbit airways in vitro. *Am. J. Physiol.* 268: L432-L437.
- Corsi MM, Ticozzi C, Netti C, Fulgenzi A, Tiengo M, Gaja G, Guidobono F, Ferrero ME (1997). The effect of somatostatin on experimental inflammation in rats. *Anesth. Analg.* 85: 1112-1115.
- Courteix S, Eschali r A, Lavarenne J (1993). Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 53: 81-88.
- Crandall M, Kwash J, Yu W, White G (2002). Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain* 98: 109-117.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper A, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405: 183-187.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP, Leceta J (2002). Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J. Mol. Med.* 80: 16-24.
- Delgado M, Leceta J, Ganea D (2003). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J. Leukoc. Biol.* 73: 155-164.
- Del Seppia C, Mezzasalma L, Choleris E, Luschi P, Ghione S (2003). Effects of magnetic field exposure on open field behaviour and nociception responses in mice. *Beh. Brain Res.* 144: 1-9.
- DeRose V, Robbins RA, Snider RM, Spurzem JR, Thiele GM, Rennard SI, Rubinstein I (1994). Substance P increases neutrophil adhesion to bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* 152: 1339-1346.
- De Swert KO, Joos GF (2006). Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur. J. Pharmacol.* 533: 171-181.
- Devor M, Seltzer Z (1999). Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: Textbook of Pain (eds: Wall PD, Melzack R), pp. 79-100, Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.
- Dickinson T, Fleetwood-Walker SM (1999). VIP and PACAP: very important in pain? *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 324-329.
- Dickinson T, Mitchell R, Robberecht P, Fleetwood-Walker SM (1999). The role of VIP/PACAP receptor subtypes in spinal somatosensory processing in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Neuropharmacology* 38: 167-180.
- Dingle JT, Page TDP, Hazleman B (1987). The role of cytokines in arthritic diseases: in vitro and in vivo measurements of cartilage degradation. *Int. J. Tissue React.* 9: 349-54.
- Dinh QT, Groneberg DA, Peiser C, Mingomataj E, Joachim RA, Witt C, Arck PC, Klapp BF, Fischer A (2004). Substance P expression in TRPV1 and trkA-positive dorsal root ganglion neurons innervating the mouse lung. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 144: 15-24.
- Doi Y, Minami T, Nishizawa M, Mabuchi T, Mori H, Ito S (2002). Central nociceptive role of prostacyclin (IP) receptor induced by peripheral inflammation. *Neuroreport* 13: 93-96.
- Donaldson LF, Harmar AJ, McQueen DS, Seckl JR (1992). Increased expression of preprotachykinin, calcitonin gene-related peptide, but not vasoactive intestinal peptide messenger RNA in dorsal root ganglia during the development of adjuvant monoarthritis in the rat. *Mol. Brain Res.* 16: 143-49.
- Dong ZQ, Xie H, Ma F, Li WM, Wang YQ, Wu GC (2005). Effects of electroacupuncture on expression of somatostatin and preprosomatostatin mRNA in dorsal root ganglions and spinal dorsal horn in neuropathic pain rats. *Neurosci. Lett.* 385: 189-194.
- Dubuisson D, Dennis SG (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161-174.
- Dun EC, Huang RL, Dun SL, Dun NJ (1996). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res.* 721: 233-237.
- Edvinsson L, Fredholm BB, Hamel E, Jansen I, Verrecchia C (1985). Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci. Lett.* 58: 213-217.
- Elekes K, Helyes Zs, Németh J, Sándor K, Pozsgai G, Kereskai L, B r sei R, Pintér E, Szabó  , Szolcsányi J (2007). Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regul. Pept.* 141: 44-54.
- Elekes K, Helyes Zs, Kereskai L, Sándor K, Pintér E, Pozsgai G, T kus V, Bánvölgyi  , Németh J, Sz ts T, Kéri Gy, Szolcsányi J (2008). Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse. *Eur. J Pharmacol.* 578: 313-322.
- Elhassan AM, Adem A, Hultenby K, Lindgren JU (1998). Somatostatin immunoreactivity in bone and joint tissues. *Neuroreport* 9: 2573-75.

- Elhassan AM, Lindgren JU, Hultenby K, Adem A (2001). Increased levels of somatostatin in rat ankles with adjuvant arthritis. *Rheum. Int.* 20: 186-91.
- Engström M, Tomperi J, El Darwish K, Ahman M, Savola JM, Würster S (2005). Superagonism at the human somatostatin receptor subtype 4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312: 332-338.
- Engström M, Savola JM, Würster S (2006). Differential efficacies of somatostatin receptor agonists for G-protein activation and desensitization of somatostatin receptor subtype 4-mediated responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316: 1262-1268.
- Eschalier A, Aumaitre O, Ardid D, Fialip J, Duchene-Marullaz P (1991). Long-lasting antinociceptive effect of RC-160, a somatostatin analog, in mice and rats. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 119-121.
- Fahrenkrug J, Hannibal J (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neuroscience* 83: 1261-1272.
- Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS (1993). Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 52: 870-75.
- Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM, Taylor PC, Williams RO, Maini RN (2005). Anti-TNF therapy: where have we got to in 2005? *J. Autoimmun.* 25: 26-28.
- Fernihough J, Gentry C, Bevan S, Winter J (2005). Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neurosci. Lett.* 388:75-80.
- Ferrel WR, Lam FY (1996). Sensory neuropeptides in arthritis. In: Neurogenic Inflammation (eds: Geppetti P, Holzer P), pp. 211-27, CRC Press, Boca Raton.
- Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego JC (2007). The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol. Rev.* 59: 88-123.
- Fioravanti A, Govoni M, La Montagna G, Perpignano G, Tirri G, Trotta F, Bogliolo A, Ciocci A, Mauceri MT, Marcolongo R (1995). Somatostatin 14 and joint inflammation: evidence for intraarticular efficacy of prolonged administration in rheumatoid arthritis. *Drugs Exp. Clin. Res.* 21: 97-103.
- Fischer A, Udem BJ (1999). Naloxone blocks endomorphin-1 but not endomorphin-2 induced inhibition of tachykinergic contractions of guinea-pig isolated bronchus. *Br. J. Pharmacol.* 127: 605-608.
- Foda HD, Sharaf HH, Absood A, Said SI (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides* 16: 1057-1061.
- Fortin JP, Marceau F (2006). Advances in the development of bradykinin receptor ligands. *Curr Top Med Chem.* 6:1353-63.
- Franco-Penteado CF, De Souza IA, Camargo EA, Teixeira SA, Muscara MN, De Nucci G, Antunes E (2005). Mechanisms involved in the enhancement of allergic airways neutrophil influx by permanent C-fiber degeneration in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: 440-448.
- Freedman J, Post C, Kahrström J, Ohlen A, Mollenholt P, Owman C, Alari L, Hökfelt T (1988). Vasoconstrictor effects in spinal cord of the substance P antagonist [D-Arg, D-Trp7,9 Leu11]-substance P (Spantide) and somatostatin and interaction with thyrotropin releasing hormone. *Neuroscience* 27: 267-278.
- Frossard N, Advenier C (1991). Tachykinin receptors and the airways. *Life Sci.* 49: 1941-1953.
- Galoyan SM, Petruska JC, Mendell LM (2003). Mechanisms of sensitization of the response of single dorsal root ganglion cells from adult rat to noxious heat. *Eur. J. Neurosci.* 18: 535-541.
- Gamse R, Leeman SE, Holzer P, Lembeck F (1981). Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P and neurotensin in the nervous system of the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 7: 140-48.
- Ganea D, Delgado M (2002). Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13: 229-237.
- Gaumann DM, Yaksh TL (1988). Intrathecal somatostatin in rats: antinociception only in the presence of toxic effects. *Anesthesiology* 68: 733-742.
- Gaumann DM, Yaksh TL, Post C, Wilcox GL, Rodriguez M (1989). Intrathecal somatostatin in cat and mouse studies on pain, motor behavior, and histopathology. *Anesth. Analg.* 68: 623-632.
- Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M (2007). Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 52-63.
- Gottschall PE, Tatsuno I, Miyata A, Arimura A (1990). Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology* 127: 272-277.
- Grant A (2002). Leukocytes and neurogenic inflammation. *Inflammopharmacology* 9: 403-420.
- Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB (2002). The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 183-191.
- Gunthorpe MJ, Szállási Á (2008). Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr. Pharm. Des.* 14: 32-41.
- Gunthorpe MJ, Chizh BA (2009). Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discovery Today* 14: 56-67.

- Gyires K, Torma Z (1984). The use of writhing test in mice for screening different types of analgesics. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 267: 131-140.
- Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 461-466.
- Han SP, Naes L, Westfall TC (1990). Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *J. Pharm. Exp. Ther.* 255: 423-428.
- Hannibal J, Ekblad E, Mulder H, Sundler F, Fahrenkrug J (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell Tissue Res.* 291: 65-79.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA (1998). International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50: 265-270.
- Harris ED (2005). Prednisolone in early rheumatoid arthritis: an antiinvasive effect. *Arthritis Rheum.* 52: 3324-3325.
- Hashiba Y, Ishikawa N, Sumita T, Takagi K, Hidaka H, Satake, T (1989). Capsaicin-sensitive nerves exert an inhibitory effect on the development of fibrin-induced pulmonary edema in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 652-658.
- Hastings RH, Hua XY (1995). Expression of calcitonin gene-related peptide by cultured rat alveolar type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13: 563-569.
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MH, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB (2000). Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88: 205-215.
- Helyes Zs, Németh J, Pintér E, Szolcsányi J (1997). Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* 121: 613-615.
- Helyes Zs, Thán M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Szolcsányi J (2000). Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci. Lett.* 278: 185-188.
- Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Kéri Gy, Thán M, Oroszi G, Horváth A, Szolcsányi J (2001). Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogues in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 134: 1571-1579.
- Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Szolcsányi J (2003). Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation. *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Curr. Med. Chem.* 2: 191-218.
- Helyes Zs, Szabó Á, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi Á, Kereskai L, Kéri Gy, Szolcsányi J (2004). Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum.* 50: 1677-1685.
- Helyes Zs, Pintér E, Szolcsányi J (2005). TT-232. Somatostatin sst1/sst4 Agonist. Treatment of Neuropathic Pain. Treatment of Inflammation. *Drugs Future* 30(6): 558
- Helyes Zs, Pintér E, Németh J, Sándor K, Elekes K, Szabó Á, Pozsgai G, Keszthelyi D, Kereskai L, Engström M, Würster S, Szolcsányi J (2006). Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 149: 405-415.
- Helyes Zs, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, Márk L, Pintér E, Tóth G, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D (2007). Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides* 28: 1847-1855.
- Helyes Zs., Pintér E., Szolcsányi J (2009). Regulatory role of sensory neuropeptides in inflammation. In: Neuropeptides and peptide analogs (eds.: Kovács M, Merchenthaler I), pp. 111-141., Research Signpost, Kerala India.
- Hendershot LC, Forsaith J (1959). Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 125: 237-240.
- Heppelmann B, Pawlak M (1997). Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed knee joints of the rat. *Pain* 73: 377-82.
- Heppelmann B, Just S, Pawlak M (2000). Galanin influences the mechanosensitivity of sensory endings in the rat knee joint. *Eur. J. Neurosci.* 12: 1567-72.
- Herbert MK, Just H, Schmidt RF (2001). Histamine excites groups III and IV afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. *Neurosci. Lett.* 305: 95-98.
- Hiruma K, Koike T, Nakamura H, Sumida T, Maeda T, Tomioka H, Yoshida S, Fujita T (1990). Somatostatin receptors on human lymphocytes and leukaemia cells. *Immunology* 71: 480-485.
- Hofland LJ, Lamberts SW (1996). Somatostatin receptors and disease: role of receptor subtypes. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 10: 163-176.

- Holzer P (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins and other neuropeptides. *Neuroscience* 86: 389-98.
- Holzer P (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 43: 143-201.
- Hong CZ, Shellock FG (1990). Short-term exposure to a 1.5 tesla static magnetic field does not affect somatosensory-evoked potentials in man. *Magn. Reson. Imaging* 8: 65-69.
- Horváth G (2000). Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous mu-opioid receptor agonists. *Pharmacol. Ther.* 88: 437-463.
- Haupt TA, Pittmann DW, Barranco JM, Brooks Eh, Smith JC (2003). Behavioural effects of high-strength static magnetic fields on rats. *J. Neurosci.* 23: 1489-1505.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE (1995). Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 86-88.
- Högyes A (1878). Beiträge zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des *Capsicum annum*. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 9: 117-130.
- Hökfelt T, Elde R, Johansson O, Luft R, Nilsson G, Arimura A (1976). Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 1: 131-136.
- Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J (2001). VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* 13: 2105-2114.
- Hughes SR, Brain SD (1994). Nitric oxide-dependent release of vasodilator quantities of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive nerves in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.* 111: 425-430.
- Inoue H, Asaka T, Nagata N, Koshihara Y (1997). Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 333: 231-240.
- Jancsó N (1960). Role of nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard Fillmore Hosp. Buffalo N.Y.* 7: 53-77.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 31: 138-151.
- Jancsó G, Király E, Jancsó-Gábor A (1977). Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270: 741-743.
- Jessell TM, Iversen LL, Cuello AC (1978). Capsaicin-induced depletion of substance P from primary sensory neurones. *Brain Res.* 152: 183-188.
- Jessop DS, Richards LJ, Harbuz MS (2002). Opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 in the immune system in humans and in a rodent model of inflammation. *Ann. NY Acad. Sci.* 966: 456-463.
- Jessop DS (2006). Endomorphins as agents for the treatment of chronic inflammatory disease. *BioDrugs* 20: 161-166.
- Jin S, Lei L, Wang Y, Da D, Zhao Z (1999). Endomorphin-1 reduces carrageenan-induced fos expression in the rat spinal dorsal horn. *Neuropeptides* 33: 281-284.
- Joe B, Wilder RL (1999). Animal models of rheumatoid arthritis. *Mol. Med. Today* 5: 367-369.
- Jones BJ, Roberts DJ (1968). A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naïve mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 259: 211.
- Joos GF, De Swert KO, Pauwels RA (2001). Airway inflammation and tachykinins: prospects for the development of tachykinin receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 239-250.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (2004). Mustard oil and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-265.
- Jorgenson C, Sany J (1994). Modulation of the immune response by the neuro-endocrine axis in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 12: 435-41.
- Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL, Gomariz RP (2008). Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 58: 1086-95.
- Kagari T, Doi H, Shimozato T (2002). The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* 169: 1459-1466.
- Kapicioglu S, Gökce E, Kapicioglu Z, Ovali E (1997). Treatment of migraine attacks with a long-acting somatostatin analogue (octreotide SMS 201-995). *Cephalalgia* 17: 27-30.
- Kar S, Gibson SJ, Rees RG, Jura WGZO, Brewerton DA, Polak JM (1990). Increased calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P, and enkephalin immunoreactivities in dorsal spinal cord and loss of CGRP-immunoreactive motor neurons in arthritic rats depend on intact peripheral nerve supply. *J. Mol. Neurosci.* 3: 7-18.

- Karalis K, Mastokaros G, Chrousos GP, Tolis G (1994). Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo. *J. Clin. Invest.* 93: 2000-6.
- Kato H, Ito A, Kawanokuchi J, Jin S, Mizuno T, Ojika K, Ueda R, Suzumura A (2004). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing the functions of antigen presenting cells. *Mult. Scler.* 10: 651-659.
- Kavaliers M, Ossenkopp KP, Hirst M (1984). Magnetic field abolish the enhanced nocturnal analgesic response to morphine in mice. *Physiol. Behav.* 32: 261-264.
- Keeble J, Brain SD (2006). Capsaicin-induced vasoconstriction in the mouse knee joint: a study using TRPV1 knockout mice. *Neurosci Lett.* 40:55-8.
- Kéri Gy, Mező I, Vadász Zs, Horváth A, Idei M, Vántus T, Balogh Á, Bökönyi Gy, Bajor T, Teplán I (1993). Structure-activity relationship studies of novel somatostatin analogs with antitumor activity. *Pept. Res.* 6: 281-288.
- Kéri Gy, Érchevyi J, Horváth A, Mező I, Idei M, Vántus T, Balogh Á, Vadász Zs, Bökönyi Gy, Seprődi J, Teplán I, Csuka O, Tejeda M, Gaál D, Szegedi Zs, Szende B, Roze C, Kalthoff H, Ullrich A (1996). A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong in vitro and in vivo antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12513-12518.
- Khalil Z, Sanderson K, Modig M, Nyberg F (1999). Modulation of peripheral inflammation by locally administered endomorphin-1. *Inflamm. Res.* 48: 550-556.
- Kim SH, Chung JM (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-363.
- Koch BD, Blalock JB, Schönbrunn A (1988). Characterization of the cyclic AMP-independent actions of somatostatin in GH cells. I. An increase in potassium conductance is responsible for both the hyperpolarization and the decrease in intracellular free calcium produced by somatostatin. *J. Biol. Chem.* 263: 216-225.
- Kolasinski SL, Haines KA, Siegel EL, Cronstein BN, Abramson SB (1992). Neuropeptides and inflammation. A somatostatin analog as a selective antagonist of neutrophil activation by substance P. *Arthritis Rheum.* 35: 369-375.
- Kraneveld AD, James DE, de Vries A, Nijkamp FP (2000). Excitatory non-adrenergic-non-cholinergic neuropeptides: key players in asthma. *Eur. J. Pharmacol.* 405: 113-129.
- Kraneveld AD, Nijkamp FP (2001). Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1629-1650.
- Krantic S (2000). Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin. *Peptides* 21: 1941-1964.
- Krantic S, Goddard I, Saveanu A, Giannetti N, Fombonne J, Cardoso A, Jaquet P, Enjalbert A. (2004). Novel modalities of somatostatin actions. *Eur. J. Endocrinol.* 151: 643-655.
- Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM (1968). Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 83: 783-790.
- Kuehl FA Jr, Zanetti ME, Soderman DD, Miller DK, Ham EA (1987). Cyclic AMP-dependent regulation of lipid mediators in white cells. A unifying concept for explaining the efficacy of theophylline in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 36: 210-213.
- Kurnatowska I, Pawlikowski M (2000). Effect of somatostatin analog-octreotide on the adjuvant arthritis in rat. *Neuroendocrinol. Lett.* 21: 121-26.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V (2007). Class II G-protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28: 1631-1639.
- Ladenius AR, Folkerts G, van der Linde HJ, Nijkamp FP (1995). Potentiation by viral respiratory infection of ovalbumin-induced guinea-pig tracheal hyperresponsiveness: role for tachykinins. *Br. J. Pharmacol.* 115: 1048-1052.
- Lagente V, Advenier C (1998). Tachykinins and Airway Function. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 11: 331-340.
- Lam FY, Ferrel WR (1991). Neurogenic component of different models of acute inflammation in the rat knee joint. *Ann. Rheum. Dis.* 50: 747-54.
- Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, Kanze SM, Polak JM, Bloom SR (1990). Binding sites of a novel neuropeptide pituitary-adenylate-cyclase-activating polypeptide in the rat brain and lung. *Eur. J. Biochem.* 193: 725-729.
- Lapa e Silva Jr, Possebon DS, Lefort J, Vargaftig BB (2000). Endotoxins, asthma, and allergic immune responses. *Toxicology* 152: 31-35.
- Larsson J, Ekblom A, Henrikson K, Lundberg T, Theodorsson E (1991). Concentration of neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 20: 326-33.
- László J, Reiczigél J, Székely L, Gasparics A, Bogár I, Bors L, Rácz B, Gyires K (2007). Optimization of static magnetic field parameters improves analgesic effect in mice. *Bioelectromagnetics* 28: 615-627.

- Lefort J, Motreff L, Vargaftig BB (2001). Airway administration of Escherichia coli endotoxin to mice induces glucocorticosteroid-resistant bronchoconstriction and vasopermeation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24: 345-351.
- Lembeck F, Holzer P (1979). Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310: 175-183.
- Lembeck F, Donnerer J, Barthó L (1982). Inhibition of neurogenic vasodilation and plasma extravasation by substance P antagonists, somatostatin and [D-Met², Pro⁵]-enkephalinamide. *Eur. J. Pharmacol.* 85: 171-176.
- Levine JD, Moskowitz MA, Basbaum AI (1985). The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J. Immunol.* 135: 843-847.
- Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM (1993). Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J. Neurosci.* 13: 2136-2148.
- Li W, Hou L, Hua Z, Wang X (2004). Interleukin-1beta induces beta-calcitonin gene-related peptide secretion in human type II alveolar epithelial cells. *FASEB J.* 18: 1603-1605.
- Lippl F, Schusdziarra V, Allescher HD (2001). Effect of endomorphin on somatostatin secretion in the isolated perfused rat stomach. *Neuropeptides* 35: 303-309.
- Lockwood DR, Kwon B, Smith JC, Haupt TA (2003). Behavioural effects of static high magnetic fields on unrestrained and restrained mice. *Physiol. Behav.* 78: 635-640.
- Long NC, Frevert CW, Shore SA (1996). Role of C fibers in the inflammatory response to intratracheal lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol.* 271: L425-L431.
- Lundberg JM (1995). Tachykinins, sensory nerves, and asthma-an overview. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 908-914.
- Mabuchi T, Shintani N, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Hashimoto H, Muratani T, Minami T, Baba A, Ito S (2004). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. *J. Neurosci.* 24: 7283-7291.
- Machelska H, Mousa SA, Brack A, Schopohl JK, Rittner HL, Schafer M, Stein C (2002). Opioid control of inflammatory pain regulated by intracellular adhesion molecule-1. *J. Neurosci.* 22: 5588-5596.
- Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, Cravatt B, Corey DP, Patapoutian A (2007). An ion channel essential for sensing chemical damage. *J. Neurosci.* 27: 11412-11415.
- Maggi CA (1995). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.* 45: 1-98.
- Maggi CA, Meli A (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 19: 1-43.
- Malmberg AB, Basbaum AI (1998). Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76: 215-222.
- Marabini S, Matucci-Cerinic M, Geppetti P, Del Bianco E, Marchesoni A, Tosi S, Cagnoni M, Partsch G (1991). Substance P and somatostatin levels in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and psoriatic arthritis synovial fluid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 632: 435-42.
- Martin-Schild S, Zadina JE, Gerall AA, Vigh S, Kastin AJ (1997). Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord. *Peptides* 18: 1641-1649.
- Massi M, Panocka I, de Garo G (2000). The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides* 21: 1597-1609.
- Matucci-Cerinic M, Marabini S (1998). Somatostatin treatment for pain in rheumatoid arthritis: a double blind versus placebo study in knee involvement. *Med. Sci. Res.* 16: 233-34.
- Matucci-Cerinic M, Borrelli F, Generini S, Cantelmo A, Marcucci I, Martelli F, Romagnoli P, Bacci S, Conz A, Marinelli P, Marabini S (1995). Somatostatin-induced modulation of inflammation in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 38: 1687-1693.
- May V, Beaudet MM, Parsons RL, Braas KM (2000). PACAP modulates rat sympathetic neuron depolarization through IP3. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 921: 186-194.
- McDougall JJ, Baker CL, Hermann PM (2004). Attenuation of knee joint inflammation by peripherally administered endomorphin-1. *J. Mol. Neurosci.* 22: 125-137.
- McDougall JJ, Barin AK (2005). The role of joint nerves and mast cells in the alteration of vasoactive intestinal peptide (VIP) sensitivity during inflammation progression in rats. *Br. J. Pharmacol.* 145: 104-113.
- McDougall JJ, Watkins L, Li Z (2006). Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis. *Pain* 123: 98-105.
- McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, Phillips E, Clarke M, Savidge J, Toms C, Peacock M, Shah K, Winter J, Weerasakera N, Webb M, Rang HP, Bevan S, James IF (2001). Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br. J. Pharmacol.* 132: 1084-1094.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339.

- Meynadier J, Chrubasik J, Dubar M, Wunsch E (1985). Intrathecal somatostatin in terminally ill patients. A report of two cases. *Pain* 23: 9-12.
- Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J, McArdle C (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *J. Neuroendocrin.* 7: 47-55.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 567-574.
- Mollenholt P, Post C, Rawal N, Freedman J, Hökfelt T, Paulsson I (1988). Antinociceptive and 'neurotoxic' actions of somatostatin in rat spinal cord after intrathecal administration. *Pain* 32: 95-105.
- Moller K, Zhang YZ, Hakanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 57: 725-732.
- Mousa SA, Machelska H, Schafer M, Stein C (2002). Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. *J. Neuroimmunol.* 126: 5-15.
- Mulder H, Uddman R, Moller K, Zhang YZ, Ekblad E, Alumets J, Sundler F (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide expression in sensory neurons. *Neuroscience* 63: 307-312.
- Muller JM, Debaigt C, Coursaud S, Montoni A, Pineau N, Meunier AC, Janet T (2007). Unconventional binding sites and receptors for VIP and related peptides PACAP and PHI/PHM: an update. *Peptides* 28: 1655-1666.
- Nagakura Y, Okada M, Kohara A, Kiso K, Toya T, Iwai A, Wanibuchi F, Yamaguchi T (2003). Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306: 490-497.
- Nagy B (2003). Az asztma definíciója és kórmechanizmusa. In: Az asztma ma (ed: Rónai Z), pp. 31-32.
- Narita M, Dun SL, Dun NJ, Tseng LF (1996). Hyperalgesia induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the mouse spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* 311: 121-126.
- Nelson DA, Bost KL (2004). Non-neuronal mammalian tachykinin expression. *Front Biosci.* 9: 2166-2176.
- Németh J, Helyes Zs, Görös T, Gardi J, Pintér E, Szolcsányi J (1996). Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol. Hung.* 84: 313-315.
- Németh J, Görös T, Helyes Zs, Oroszi G, Kocsy T, Pintér E, Szolcsányi J (1998). Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology (Bp)* 6: 473-475.
- Németh J, Szilvássy Z, Thán M, Oroszi G, Sári R, Szolcsányi J (1999). Decreased sensory neuropeptide release from trachea of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 369: 221-224.
- Németh J, Helyes Zs, Oroszi G, Jakab B, Pintér E, Szilvássy Z, Szolcsányi J (2003). Role of voltage-gated cation channels and axon reflexes in the release of sensory neuropeptides by capsaicin from isolated rat trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 458: 313-318.
- Németh J, Reglödi D, Pozsgai G, Szabó Á, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2006). Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* 143: 223-230.
- Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J, Konttinen YT (2002). Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.* 966: 384-399.
- Njuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, Legon S (1993). A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin. Sci. (Lond.)* 85: 385-388.
- Nolte CM, Pittmann DW, Kalevitch B, Henderson R, Smith JC (1998). Magnetic field conditioned taste aversion in rats. *Physiol. Behav.* 63: 683-688.
- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cell. Physiol.* 201: 167-180.
- Odum L, Petersen LJ, Skov PS, Ebskov LB (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells. *Inflamm. Res.* 47: 488-492.
- Oh U, Hwang SW, Kim D (1996). Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 16: 1659-1667.
- Ohsawa M, Brailoiu GC, Shiraki M, Dun NJ, Paul K, Tseng LF (2002). Modulation of nociceptive transmission by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the spinal cord of the mouse. *Pain* 100: 27-34.
- Onou T, Shimizu T, Sakamoto H, Higashi M, Kanmura Y, Miyata A (2007). Involvement of opioidergic system in supraspinal PACAP analgesia and the tolerance. *J. Mol. Neurosci.* 33: 339.
- Page NM (2004). Hemokininins and endokininins. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1652-1663.
- Parsons JA, Erlandsen SL, Hegre OD, McEvoy RC, Elde RP (1976). Central and peripheral localization of somatostatin. Immunoenzyme immunocytochemical studies. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 872-882.

- Parsons CG, Czlonkowski A, Stein C, Herz A (1990). Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Activation by endogenous opioids and role of the pituitary-adrenal axis. *Pain* 41: 81-93.
- Parsons RL, Rossignol TM, Calupca MA, Hardwick JC, Brass KM (2000). PACAP peptides modulate guinea pig cardiac neuron membrane excitability and neuropeptide expression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 921: 202-210.
- Patacchini R, Maggi CA (2001). Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 13-21.
- Patel YC (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol.* 20: 157-198.
- Penn AL, Rouse RL, Horohov DW, Kearney MT, Paulsen DB, Lomax L (2007). In utero exposure to environmental tobacco smoke potentiates adult responses to allergen in BALB/c mice. *Environ. Health Perspect.* 115: 548-555.
- Pintér E, Helyes Zs, Németh J, Pórszász R, Pethő G, Thán M, Kéri Gy, Horváth A, Jakab B, Szolcsányi J (2002). Pharmacological characterisation of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 366: 142-150.
- Pintér E, Helyes Zs, Szolcsányi J (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol. Ther.* 112: 440-456.
- Pintér E, Helyes Zs, Németh J, Szolcsányi J (2009). Somatostatin as an anti-inflammatory neuropeptide. In: Neurogenic Inflammation, Neuroimmune biology (eds: Fischer A, Jancsó G), pp. 121-134., Elsevier Science, The Netherlands.
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez DF (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 218-224.
- Plourde V, Lembo T, Shui Z, Parker J, Mertz H, Taché Y, Sytnik B, Mayer E (1993). Effects of the somatostatin analogue octreotide on rectal afferent nerves in humans. *Am. J. Physiol.* 265: G742-751.
- Pol O, Puig MM (2004). Expression of opioid receptors during peripheral inflammation. *Curr. Top. Med. Chem.* 4: 51-61.
- Poole S, Cunha FQ, Selkirk S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1995). Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br. J. Pharmacol.* 115: 684-688.
- Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM (2002). International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.* 54: 233-246.
- Prato FS, Robertson JA, Desjardins D, Hensel J, Thomas AW (2005). Daily repeated magnetic field shielding induces analgesia in CD-1 mice. *Bioelectromagnetics* 26: 109-117.
- Premkumar LS, Ahern GP (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408: 985-990.
- Przewlocki R, Przewlocka B (2001). Opioids in chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 79-91.
- Puehler W, Zöllner C, Brack A, Shaqura MA, Krause H, Schafer M, Stein C (2004). rapid upregulation of μ opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neuroscience* 129: 473-479.
- Rashid MH, Inoue M, Bakoshi S, Ueda H (2003). Increased expression of vanilloid receptor 1 on myelinated primary afferent neurons contributes to the antihyperalgesic effect of capsaicin cream in diabetic neuropathic pain in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306: 709-717.
- Raynor K, Reisine T (1992). Somatostatin receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* 6: 273-289.
- Reeser JC, Smith DT, Fischer V, Berg R, Liu K, Untiedt C, Kubista M (2005). Static magnetic fields neither prevent nor diminish symptoms and signs of delayed onset muscle soreness. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 86: 565-570.
- Regoli D, Boudon A, Fauchere JL (1994). Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol. Rev.* 46: 551-599.
- Reichlin S (1983). Somatostatin. *N. Engl. J. Med.* 309: 1495-1501.
- Rennick RE, Loesch A, Burnstock G (1992). Endothelin, vasopressin, and substance P like immunoreactivity in cultured and intact epithelium from rabbit trachea. *Thorax* 47: 1044-1049.
- Reubi JC, Laissue JA, Waser B, Steffen DL, Hipkin W, Schonbrunn A (1999). Immunohistochemical detection of somatostatin sst_{2a} receptors in the lymphatic, smooth muscular, and peripheral nervous systems of the human gastrointestinal tract: facts and artifacts. *J. Clin. Endocrin. Metabol.* 84: 2942-2950.
- Rocksen D, Ekstrand-Hammarstrom B, Johansson L, Bucht A (2003). Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28: 199-207.
- Rosen AD (1996). Inhibition of calcium channel activation in GH3 cells by static magnetic fields. *Biochim. Biophys. Acta* 1148: 149-155.
- Rosen AD (2003). Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. *Cell Biochemistry and Biophysics* 39: 163-173.

- Said SI (2000). VIP and PACAP in pain and inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 57.
- Sanake T, Suzuki N (1998). The role of somatostatin in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 16: 745-49.
- Sanderson K, Nyberg F, Khalil Z (1998). Modulation of peripheral inflammation by locally administered hemorphin-7. *Inflamm. Res.* 47: 49-55.
- Shaqura MA, Zöllner C, Mousa SA, Stein C, Schafer M (2004). Characterization of μ opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308: 712-718.
- Saunders R (2005). Static magnetic fields: animal studies. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 87: 225-239.
- Savov JD, Gavett SH, Brass DM, Costa DL, Schwartz DA (2002). Neutrophils play a critical role in development of LPS-induced airway disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283: L952-L962.
- Saxler G, Löer F, Skumavc M, Pfortner J, Hanesch U (2007). Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. *Eur. J. Pain* 11: 67-74.
- Sándor K, Bölcskei K, McDougall JJ, Schuelert N, Reglődi D, Elekes K, Pethő G, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2009). Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 on nociception in rats and mice. *Pain* 141: 143-150.
- Schafer M, Mousa SA, Zhang Q, Carter L, Stein C (1996). Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6096-6100.
- Schuelert N, McDougall JJ (2006). Electrophysiological evidence that the vasoactive intestinal peptide receptor antagonist VIP6-28 reduces nociception in an animal model of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 14: 1155-1162.
- Schwab W, Bilgicildirim A, Funk RHW (1997). Microtopography of the autonomic nerves in the rat knee: a fluorescence microscopic study. *Anat. Rec.* 247: 109-18.
- Segre GV, Goldring SR (1993). Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, glucagon-like peptide 1, growth hormone releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol. Metab.* 4: 309-314.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-218.
- Selye H (1965). The mast cells. Washington, Butterworths.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000). The origin and function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.* 21: 619-670.
- Shigyo M, Aizawa H, Inoue H, Matsumoto K, Takata S, Hara N (1998). Pituitary adenylate cyclase activating peptide regulates neurally mediated airway responses. *Eur. Respir. J.* 12: 64-70.
- Shimizu T, Katahira M, Sugawara H, Inoue K, Miyata A (2004). Diverse effects of intrathecal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on nociceptive transmission in mice spinal cord. *Regul. Pept.* 123: 117-122.
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung JY, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U (2002). Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10150-10155.
- Shioda S, Nakai Y, Nakajo S, Nakaya K, Arimura A (1996). Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its type I receptors in the rat ovary: Immunohistochemistry and in situ hybridization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 805: 677-683.
- Shu XQ, Mendell LM (2001). Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. *J. Neurophysiol.* 86: 2931-2938.
- Shupak NM, Hensel JM, Cross-Mellor SK, Kavaliers M, Prato FS, Thomas AW (2004). Analgesic and behavioral effects of a 100 microT specific pulsed extremely low frequency magnetic field on control and morphine-treated CF-1 mice. *Neurosci. Lett.* 354: 30-33.
- Silveri F, Morosini P, Brecciaroli D, Cervini C (1994). Intra-articular injection of somatostatin in knee osteoarthritis: clinical results and IGF-1 serum levels. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 14: 79-85.
- Skofitsch G, Donnerer J, Petronijevic S, Saria A, Lembeck F (1983). Release of histamine by neuropeptides from the perfused rat hindquarter. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 322: 153-157.
- Somogyvári-Vígh A, Reglődi D (2004). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr. Pharm. Des.* 10: 2861-2889.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365: 170-175.
- Springer J, Geppetti P, Fischer A, Groneberg DA (2003). Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 16: 121-130.
- Stein C (1995). The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N. Engl. J. Med.* 332: 1685-1690.

- Stein C, Hassan AHS, Przewlocki R., Gramsch C., Peter K., Herz A (1990). Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 5935-5939.
- Stein C, Machelska H, Binder W, Schafer M (2001). Peripheral opioid analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1: 62-65.
- Steinhoff M, McGregor GP, Radleff-Schlimme A, Steinhoff A, Jarry H, Schmidt WE (1999). Identification of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP type 1 receptor in human skin: expression of PACAP-38 is increased in patients with psoriasis. *Regul. Pept.* 80: 49-55.
- Suda K, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR (1992). Investigation of the interaction of VIP binding sites with VIP and PACAP in human brain. *Neurosci. Lett.* 137: 19-23.
- Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K (2002). Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J. Neurophysiol.* 88: 544-548.
- Szabó Á, Helyes Zs, Sándor K, Bite A, Pintér E, Németh J, Bánvölgyi Á, Bölcskei K, Elekes K, Szolcsányi J (2005). Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: *in vivo* study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314: 111-119.
- Szabó Á, Czirják L, Sándor Z, Helyes Zs, László T, Elekes K, Starr A, Brain S, Szolcsányi J, Czömpöly T, Pintér E (2008). Investigation of sensory neurogenic components in bleomycin-induced scleroderma model using TRPV1 receptor and CGRP knockout mice. *Arthritis Rheum.* 58: 292-301.
- Szállási Á, Blumberg PM (1989). Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30: 515-520.
- Szállási Á, Blumberg PM (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51: 159-212.
- Szolcsányi J (1977). A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. (Paris)* 73: 251-259.
- Szolcsányi J (1984a). Capsaicin and neurogenic inflammation: history and early findings. In: Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation (eds: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F), pp. 7-26, Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Szolcsányi J (1984b). Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation (eds: Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F), pp. 27-53, Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Szolcsányi J (1985). Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: Tachykinin Antagonists (eds: Hakanson R, Sundler F), pp. 45-54, Elsevier, Amsterdam.
- Szolcsányi J (1987). Capsaicin and nociception. *Acta Physiol. Hung.* 69: 323-332.
- Szolcsányi J (1988). Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Agents Actions* 23: 4-11.
- Szolcsányi J (1993). Actions of capsaicin on sensory receptors. In: Capsaicin in the study of pain (ed: Wood JN), pp. 1-26, Academic Press, London.
- Szolcsányi J (1996a). Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In: Neurogenic Inflammation (eds: Geppetti P, Holzer P), pp. 33-42.
- Szolcsányi J (1996b). Capsaicin-sensitive sensory nerve terminals with local and systemic efferent functions: facts and scopes of an unorthodox neuroregulatory mechanism. *Prog. Brain Res.* 113: 343-359.
- Szolcsányi J (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* 38: 377-384.
- Szolcsányi J (2008). Hot target on nociceptors: perspectives, caveats and unique features. *Br. J. Pharmacol.* 155: 1142-1144.
- Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A (1975). Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung* 25: 1877-1881.
- Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A (1976). Sensory effects of capsaicin congeners II: Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung* 26: 33-37.
- Szolcsányi J, Barthó L (1982). Capsaicin-sensitive non-cholinergic excitatory innervation of the guinea-pig tracheobronchial smooth muscle. *Neurosci. Lett.* 34: 247-251.
- Szolcsányi J, Szállási Á, Szállási Z, Joó F, Blumberg PM (1990). Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 923-928.
- Szolcsányi J, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J, Pintér E (1998a). Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.* 123: 936-942.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J (1998b). Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br. J. Pharmacol.* 125: 916-922.

- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs (2004). Sensocrine function of capsaicin-sensitive nociceptors mediated by somatostatin regulates against inflammation and hyperalgesia. *In: Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications* (eds: Handwerker HO, Brune K), pp.113-128, IASP Press, Seattle.
- Taiwo YO, Levine JD (1991). Further confirmation of the role of adenyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 44: 131-135.
- Taiwo YO, Heller PH, Levine JD (1992). Mediation of serotonin hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 48: 479-483.
- Tajti J, Vécsei L (2006). Mozgásszervi megbetegedéseket utánzó neuropátiás fájdalom patomechanizmusa és terápiája. *Magyar Tudomány* 167: 1191-1196.
- Tatsuno I, Gottschall PE, Köves K, Arimura A (1990). Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 1027-1033.
- Taura P, Planella V, Balust J, Beltran J, Anglada T, Carrero E, Burgués S (1994). Epidural somatostatin as an analgesic in upper abdominal surgery: a double-blind study. *Pain* 59: 135-140.
- ten Bokum AMC, Lichtenauer-Kaligis EGR, Melief MJ, van Koetsveld PM, Bruns C, van Hagen PM, Hofland LJ, Lamberts SWJ, Hazenberg MP (1999). Somatostatin receptor subtype expression in cells of the rat immune system during adjuvant arthritis. *J. Endocrinol.* 161: 167-75.
- ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM (2000). Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. *Eur. Cytokine Netw.* 11: 161-176.
- Thán M, Németh J, Szilvássy Z, Pintér E, Helyes Zs, Szolcsányi J (2000). Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.* 399: 251-258.
- Thorne PS, Kulhankova K, Yin M, Cohn R, Arbes SJ Jr, Zeldin DC (2005). Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172: 1371-1377.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543.
- Tornøe K, Hannibal J, Georg B, Schmidt PT, Hilsted L, Fahrenkrug J, Holst JJ (2001). PACAP 1-38 as neurotransmitter in the porcine antrum. *Regul. Pept.* 101: 109-121.
- Uddman R, Hakanson R, Luts A, Sundler F (1997). Distribution of neuropeptides in airways. Harwood Academic Press, London, pp.21-37.
- Uddman R, Grunditz T, Kato J, Sundler F (1998). Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. *Anat. Embryol.* 197: 273-282.
- Ueda H (2006). Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 109: 57-77.
- Ulich TR, Guo KZ, Irwin B, Remick DG, Davatelis GN (1990). Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. II. Regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 alpha/beta expression and suppression. *Am. J. Pathol.* 137: 1173-1185.
- Underwood S, Foster M, Raeburn D, Bottoms S, Karlsson JA (1995). Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea-pig and its relationship to airway hyperresponsiveness. *Eur. Respir. J.* 8: 2104-2113.
- van Rossum D, Hanisch U, Quirion R (1997). Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21: 649-678.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52: 269-324.
- Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rouselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ (2002). PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1451-1460.
- Vántus T, Csermely P, Teplán I, Kéri Gy (1995). The tumor-selective somatostatin analog, TT2-32 induces a biphasic activation of phosphotyrosine phosphatase activity in human colon tumor cell line, SW620. *Tumour. Biol.* 16: 261-267.
- Vántus T, Kéri Gy, Krivickiene Z, Valius M, Stetak A, Keppens S, Csermely P, Bauer PI, Bökönyi Gy, Declercq W, Vandenabeele P, Merlevede W, Vandenheede JR (2001). The somatostatin analogue TT-232 induces apoptosis in A431 cells: sustained activation of stress-activated kinases and inhibition of signalling to extracellular signal-regulated kinases. *Cell Signal* 13: 717-725.
- Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* 534: 813-825.

- Vécsei L, Widerlöv E (1988). Brain and CSF somatostatin concentrations in patients with psychiatric or neurological illness. An overview. *Acta Psychiatr. Scand.* 78: 657-667.
- Vigh S, Arimura A, Gottschall PE, Kitada C, Somogyvári-Vigh A, Childs GV (1993). Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. *Peptides* 14: 59-65.
- Wagner U, Fehmann HC, Bredenkroder D, Yu F, Barth PJ, von Wichert P (1995). Galanin and somatostatin inhibition of neurokinin A and B induced airway mucus secretion in the rat. *Life Sci.* 57: 283-289.
- Wang ZY, Waldeck K, Grundemar L, Hakanson R. (1997). Ocular inflammation induced by electroconvulsive treatment: contribution of nitric oxide and neuropeptides mobilized from C-fibres. *Br J Pharmacol.* 120: 1491-1496.
- Warren JB, Wilson AJ, Loi RK, Coughlan ML (1993). Opposing roles of cyclic AMP in the vascular control of edema formation. *FASEB J.* 7: 1394-1400.
- Watanabe N, Horie S, Michael GJ, Spina D, Page CP, Priestley JV (2005). Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 18: 187-197.
- Watson GS, Sufka KJ, Coderre TJ (1997). Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. *Pain* 70: 53-58.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C (2003). Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 999-1017.
- Weinberg A, Halpern M, Zahalka MA, Quintana F, Traub L, Moroz C (2003). Placental immunomodulator ferritin, a novel immunoregulator, suppresses experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 48: 846-853.
- Welk E, Fleischer E, Petsche U, Handwerker HO (1984). Afferent C-fibres in rats after neonatal capsaicin treatment. *Pflügers Arch.* 400: 66-71.
- Weston MC, Peachell PT (1998). Regulation of human mast cell and basophil function by cAMP. *Gen. Pharmacol.* 31: 715-719.
- Wieraszko A (2000). Dantrolene modulates the activity of steady magnetic fields on hippocampal evoked potentials in vitro. *Bioelectromagnetics* 21: 175-182.
- Witkin LB, Heuter CF, Galdi F, O'Keefe E, Spitaletta P, Plummer AJ (1961). Pharmacology of 2-amino-indane hydrochloride (Su-8629), a potent non-narcotic analgesic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 133: 400-408.
- Wray V, Kokoschke C, Nokihara K, Naruse S (1993). Solution structure of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32: 5832-5841.
- Xie QM, Chen JQ, Shen WH, Bian RL (2002). Correlative changes of interferon-gamma and interleukin-4 between cortical layer and pulmonary airway of sensitized rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 23: 248-252.
- Yamamoto T, Tatsuno I (1995). Antinociceptive effect of intrathecally administered pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on the rat formalin test. *Neurosci. Lett.* 184: 32-35.
- Zadina JE, Hackler L, Lin-Jun G, Kastin AJ (1997). A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature* 386: 499-502.
- Zeldin DC, Wohlford-Lenane C, Chulada P, Bradbury JA, Scarborough PE, Roggli V, Langenbach R, Schwartz DA (2001). Airway inflammation and responsiveness in prostaglandin H synthase-deficient mice exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25: 457-465.
- Zhang Y, Malmberg AB, Sjolund B, Yaksh TL (1996). The effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) on the nociceptive formalin test. *Neurosci. Lett.* 207: 187-190.
- Zhang Y, Malmberg AB, Yaksh TL, Sjölund B, Sundler F, Hakanson R (1997). Capsaicin-evoked release of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) from rat spinal cord in vivo. *Regul. Pept.* 69: 83-87.
- Zhang Y, Danielsen N, Sundler F, Mulder H (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is upregulated in sensory neurons by inflammation. *Neuroreport* 9: 2833-2836.
- Zheng YQ, Wei W, Dai M, Zhu L, Jia XY, Wang Y (2006). Interleukin-1 receptor antagonist intervenes in signaling between different types of synoviocytes in rats with adjuvant arthritis. *Acta Pharmacol. Sin.* 27: 111-118.
- Zhou CJ, Shioda S, Yada T, Inagaki N, Pleasure SJ, Kikuyama S (2002). PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 423-439.
- Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110.
- Zöllner C, Shaqura MA, Bopaiah CP, Stein C, Schafer M (2003). Painful inflammation-induced increase of μ -opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol. Pharmacol.* 64: 202-210.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

I. témakör:

Helyes Zs., Elekes K., Németh J., Pozsgai G., Sándor K., Kereskai L., Börzsei R., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse. *Am. J. Physiol. – Lung Cell. Mol. Physiol.* 292(5): 1173-1181, 2007. (IF: 4.214)

Elekes K., **Helyes Zs.**, Németh J., Sándor K., Pozsgai G., Kereskai L., Börzsei R., Pintér E., Szabó Á., Szolcsányi J.: Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regul. Pept.* 141(1-3): 44-54, 2007. (IF: 2.422; azonos közreműködés Elekes K. és Helyes Zs. részéről a publikációban megjelölve)

Elekes K., **Helyes Zs.**, Kereskai L., Sándor K., Pintér E., Pozsgai G., Tékus V., Bánvölgyi Á., Németh J., Szűts T., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 578(2-3): 313-322, 2008. (IF: 2.376; azonos közreműködés Elekes K. és Helyes Zs. részéről a publikációban megjelölve)

Varecza Z., Elekes K., László T., Perkecz A., Pintér E., Sándor Z., Szolcsányi J., Keszthelyi D., Szabó Á., Sándor K., Molnár F. T., Szántó Z., Pongrácz J. E., **Helyes Zs.**: Expression of the somatostatin receptor subtype 4 in intact and inflamed pulmonary tissues; *közlésre elküldve*.

II. témakör:

Helyes Zs., Szabó Á., Németh J., Jakab B., Pintér E., Bánvölgyi Á., Kereskai L., Szolcsányi J.: Anti-inflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model of the rat. *Arthritis Rheum.* 50: 1677-1685, 2004. (IF: 7.414)

Szabó Á., **Helyes Zs.**, Sándor K., Bite A., Pintér E., Németh J., Bánvölgyi Á., Bölskei K., Elekes K., Szolcsányi J.: Role of TRPV1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: *in vivo* study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314(1): 111-119, 2005. (IF: 4.098; azonos közreműködés Szabó Á. és Helyes Zs. részéről a publikációban megjelölve)

Helyes Zs., Pintér E., Sándor K., Elekes K., Bánvölgyi Á., Keszthelyi D., Szőke É., Tóth D.M., Sándor Z., Kereskai L., Pozsgai G., Allen J.P., Emson P.C., Markovics A., Szolcsányi J.: Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice; *közlésre elküldve*

III. témakör:

Szolcsányi J., Bölskei K., Szabó Á., Pintér E., Pethő, G., Elekes K., Börzsei R., Almási R., Szűts T., Kéri Gy., **Helyes Zs.**: Analgesic effect of TT-232, a heptapeptide somatostatin analogue, in acute pain models of the rat and the mouse and in streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 498: 103-109, 2004. (IF: 2.432)

Bölcseki K., **Helyes Zs.**, Szabó Á., Sándor K., Pethő G., Elekes K., Almási R., Pintér E., Szolcsányi J.: Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 117(3): 368-376, 2005. (IF: 4.309; azonos közreműködés Bölcseki K. és Helyes Zs. részéről a publikációban megjelölve)

Sándor K., Elekes K., Szabó Á., Pintér E., Engström M., Würster S., Szolcsányi J., **Helyes Zs.**: Analgesic effects of the somatostatin sst₄ receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *Eur. J. Pharmacol.* 539(1-2): 71-75, 2006. (IF: 2.522)

Sándor K., **Helyes Zs.**, Gyires K., Szolcsányi J., László J.: Static magnetic field-induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism. *Life Sci.* 81(2): 97-102, 2007. (IF: 2.257; azonos közreműködés Sándor K. és Helyes Zs. részéről a publikációban megjelölve)

Sándor K., Bölcseki K., McDougall J.J., Schuelert N., Reglődi D., Elekes K., Pethő G., Pintér E., Szolcsányi J., **Helyes Zs.**: Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 on nociception in rats and mice. *Pain* 141(1-2): 143-150, 2009. (IF: 5.249)

IV. témakör:

Helyes Zs., Pintér E., Németh J., Sándor K., Elekes K., Szabó Á., Pozsgai G., Keszthelyi D., Kereskai L., Engström M., Würster S., Szolcsányi J.: Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 149(4): 405-415, 2006. (IF: 3.825)

Németh J., Reglődi D., Pozsgai G., Szabó Á., Elekes K., Pintér E., Szolcsányi J., **Helyes Zs.**: Effect of PACAP-38 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rats and mice. *Neuroscience* 143: 223-30: 2006. (IF: 3.427)

Helyes Zs., Pozsgai G., Börzsei R., Németh J., Bagoly T., Márk L., Pintér E., Tóth G., Elekes K., Szolcsányi J., Reglődi D.: Inhibitory effect of PACAP-38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides* 28(9): 1847-55, 2007. (IF: 2.368)

Börzsei R., Pozsgai G., Bagoly T., Elekes K., Pintér E., Szolcsányi J., **Helyes Zs.**: Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* 152(1): 82-8: 2008. (IF: 3.352)

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ ÖSSZEFOGLALÓ KÖZLEMÉNYEK, KÖNYVFEJEZETEK

Helyes Zs., Pintér E., Németh J., Szolcsányi J.: Pharmacological targets for the inhibition of neurogenic inflammation (felkért összefoglaló) *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Current Medicinal Chemistry* 2, 191-218, 2003.

Helyes Zs.: Role of μ -opioid receptors in Arthritis: Are They Potential Targets for Therapy? (szerkesztői felkérésre írt összefoglaló) *Arthritis Rheum.* 52(10), 2955-2959, 2005. (IF: 7.421)

Helyes Zs., Pintér E., Szolcsányi J.: TT-232. Somatostatin sst₁/sst₄ receptor agonist, treatment of neuropathic pain, treatment of inflammation. (felkért összefoglaló) *Drugs Fut.* 30(6), 558-566, 2005. (IF: 0.547)

Pintér E., **Helyes Zs.**, Szolcsányi J.: Somatostatin, as an anti-inflammatory and antinociceptive neuropeptide (felkért összefoglaló) *Pharmacol. Therap.* 112, 440-56. 2006. (IF: 8.66)

Pintér E., **Helyes Zs.**, Németh J., Szolcsányi J.: Somatostatin as an Anti-Inflammatory Neuropeptide: From Physiological Basis to Drug Development (felkért összefoglaló) *In: Neurogenic Inflammation in Health and Disease*, pp. 121-134, *Ed: Jancsó G.*, Elsevier, 2009.

Helyes Zs., Pintér E., Szolcsányi J.: Regulatory role of sensory neuropeptides in inflammation (felkért összefoglaló), *In: Neuropeptides and peptide analogs*, Vol. 7, pp. 111-141, *Eds: Kovács M. and Merchenthaler I.*, Research Signpost, Kerala, India, 2009.

A dolgozat alapját képező közlemények összesített impakt faktora 66.893 (az eredeti közleményeké 50.265, az összefoglalóké 16.628)

Ezekre a közleményekre történő összes független hivatkozás (SCI): 141

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

Helyes Zs., Than M., Oroszi G., Pintér E., Németh J., Kéri Gy., Szolcsányi J.: Antinociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogs in the rat. *Neurosci. Lett.* 278: 285-288, 2000. (IF: 2.13)

Than M., Németh J., Pintér E., Szilvássy Z., **Helyes Zs.**, Szolcsányi J.: Systemic anti-inflammatory effect and somatostatin release from capsaicin-sensitive vagal and sciatic fibres in rats and guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 399: 251-258. 2000. (IF: 2.24)

Helyes Zs., Pintér E., Németh J., Kéri Gy., Than M., Oroszi G., Horváth A., Szolcsányi J.: Anti-inflammatory effect of synthetic somatostatin analogs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 134: 1571-1579, 2001. (IF: 3.502)

Pintér E., **Helyes Zs.**, Németh J., Pórszász R., Pethő G., Than M., Kéri Gy., Horváth A., Jakab B., Szolcsányi J.: Pharmacological characterization of the somatostatin analogue TT-232: effects on neurogenic and non-neurogenic inflammation and neuropathic hyperalgesia. *N. S. Arch. Pharmacol.* 366: 142-150, 2002. (IF: 2.57)

Helyes Zs., Németh J., Than M., Bölcskei K., Pintér E., Jakab B. and Szolcsányi J.: Inhibitory effect of anandamide and palmitylethanolamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release *in vivo* and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci.* 73: 2345-2353, 2003. (IF: 1.944)

Németh J., **Helyes Zs.**, Than M., Jakab B., Pintér E., Szolcsányi J.: Concentration-dependent dual effect of anandamide on sensory neuropeptide release from isolated rat tracheae. *Neurosci. Lett.* 336: 89-92, 2003. (IF: 1.967)

Németh J., **Helyes Zs.**, Oroszi G., Jakab B., Pintér E., Szilvássy Z., Szolcsányi J.: Role of voltage-gated cation channels and axon-reflexes in the release of sensory neuropeptides by capsaicin from isolated rat trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 458: 313-318, 2003. (IF: 2.352)

Bánvölgyi Á., Pozsgai G., Brain S.D., **Helyes Zs.**, Szolcsányi J., Ghosh M., Meleg B., Pintér E.: Mustard oil induces a TRPV1 receptor independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component. *Neuroscience*, 125: 449-459, 2004. (IF: 3.456)

Jakab B., **Helyes Zs.**, Varga A., Bölskei K., Szabó Á., Sándor K., Elekes K., Börzsei R., Pintér E., Pethő G., Németh J., Szolcsányi J.: Examination of the novel TRPV1 receptor antagonist JYL1421 (SC0030) *in vitro* and *in vivo* in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 517(1-2): 35-44. 2005. (IF: 2.477; azonos közreműködés Jakab B. és Helyes Zs. részéről a publikációban megjelölve)

Varga A., Németh J., Szabó Á., McDougall J.J., Zhang C., Elekes K., Pintér E., Szolcsányi J., **Helyes Zs.**: Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 *in vitro* and *in vivo* in the rat. *Neurosci. Lett.* 385:137-142, 2005. (IF: 1.898)

Bánvölgyi Á., Pálincás L., Berki T., Clark N., Grant A.D., **Helyes Zs.**, Pozsgai G., Szolcsányi J., Brain S.D., Pintér E.: Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *J. Neuroimmunol.* 169: 86-96, 2005. (IF: 2.824)

Horváth P., Szilvássy Z., Peitl B., Szilvássy J., **Helyes Zs.**, Szolcsányi J., Németh J.: Changes in tracheo-bronchial sensory neuropeptide receptor gene expression pattern in rats with cisplatin-induced sensory neuropathy. *Neuropeptides* 40: 77-83, 2006. (IF: 2.789)

Pozsgai G., Sándor K., Perkecz A., Szolcsányi Zs., **Helyes Zs.**, S.D. Brain, Pintér E.: Topical acetone treatment induces neurogenic oedema on the sensitized mouse ear: an *in vivo* study using transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor knockout mice. *Inflamm. Res.* 56: 459-467. 2007. (IF: 1.504)

Reglődi D., Börzsei R., Bagoly T., Boronkai A., Rácz B., Tamás A., Kiss P., Horváth G., Brubel R., Németh J., Tóth G., **Helyes Zs.**: Agonistic Behavior of PACAP6-38 on Sensory Nerve Terminals and Cytotrophoblast Cells. *J. Mol. Neurosci.* 36(1-3): 270-278. 2008. (IF: 1.735)

Szabó Á., Czirják L., Sándor Z., **Helyes Zs.**, László T., Elekes K., Starr A., Brain S., Szolcsányi J., Cömpöly T., Pintér E.: Investigation of sensory neurogenic components in bleomycin-induced scleroderma model using TRPV1 receptor and CGRP knockout mice. *Arthritis Rheum.* 58(1): 292-301, 2008. (IF: 7.677)

Sándor K., **Helyes Zs.**, Elekes K., Szolcsányi J.: Involvement of the capsaicin-sensitive afferents and the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in xylene-induced nocifensive behaviour and inflammation in the mouse. *Neurosci. Lett.* 45(3): 204-207, 2009. (IF: 2.085; azonos közreműködés Sándor K. és Helyes Zs. részéről a publikációban megjelölve)

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ EGYÉB EREDETI KÖZLEMÉNYEK

A PhD megszerzése előtt:

Helyes Zs., Pintér E., Szolcsányi J., Horváth J.: Anti-inflammatory and antinociceptive effect of different somatostatin-analogs. *Neurobiology* 4: 115-117, 1996.

Pintér E., Szolcsányi J., **Helyes Zs.**: Neurotransmitter background of the anti-inflammatory effect evoked by activation of sensory nerve fibers. *Neurobiology* 4: 233-235, 1996.

Pintér E., **Helyes Zs.**, Pethő G., Szolcsányi J.: Non-adrenergic regulation of microcirculation evoked by antidromic stimulation of the saphenous nerve in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 84 (3): 239-240, 1996.

Németh J., **Helyes Zs.**, Görcs T., Gardi J., Pintér E., Szolcsányi J.: Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol. Hung.* 84 (3): 313-315, 1996.

Horváth J., **Helyes Zs.**, Flerkő B.: Gonadectomy modifies the gender specific pattern of desensitization of pituitary cells by gonadotropin-releasing hormone in the superfusion system. *Acta Biol. Hung.* 47: 329-339, 1996. (IF: 0.24)

Moody G.A., Eaden J.A., Helyes Zs., Mayberry J.F.: Oral or rectal administration of drugs in IBD? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11: 999-1000, 1997. (lektorált levél; IF: 3.00)

Pintér E., **Helyes Zs.**, Pethő G., Szolcsányi J.: Noradrenergic and peptidergic regulation of cutaneous microcirculation in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 325, 57-64, 1997. (IF: 1.96)

Helyes Zs., Németh J., Pintér E., Szolcsányi J.: Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* 121: 613-615, 1997. (IF: 3.62)

Szolcsányi J., **Helyes Zs.**, Oroszi G., Németh J., Pintér E.: Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of the rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.* 123: 936-942, 1998. (IF: 3.70)

Szolcsányi J., Pintér E., **Helyes Zs.**, Oroszi G., Németh J.: Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br. J. Pharmacol.* 125: 916-922, 1998. (IF: 3.70)

Németh J., **Helyes Zs.**, Oroszi G., Than M., Pintér E., Szolcsányi J.: Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 347: 101-104, 1998. (IF: 1.99)

Németh J., Görcs T., **Helyes Zs.**, Oroszi G., Kocsy T., Pintér E., Szolcsányi J.: Development of a new sensitive radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology* 6 (4): 473-475, 1998.

Németh J., Oroszi G., Than M., **Helyes Zs.**, Pintér E., Farkas B., Szolcsányi, J.: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release. *Neurobiology* 7(4): 437-444, 1999.

A PhD megszerzése után:

Németh J., Vecsernyés M., Oroszi G., Balla Zs., **Helyes Zs.**, Farkas B., Szilvássy Z.: Preparation of Mono-125I-labelled gastrin-17 for Radioimmunoassay Measurements. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 43: 855-863, 2000. (IF: 0.84)

Börzsei L., Mintal T., Koós Z., Kocsis B., **Helyes Zs.**, Kereskai L., Nyárády J.: Examination of a Novel, Specified Local Antibiotic Therapy through Polymethylmethacrylate Capsules in a Rabbit Osteomyelitis Model. *Chemotherapy* 52: 73-79, 2006. (IF: 1.511)

Börzsei R., Márk L., Tamás A., Bagoly T., Bay Cs., Csanaky K., Bánki E., Kiss P., Váczy A., Horváth G., Németh J., Szauer E., **Helyes Zs.**, Reglődi D.: Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 (PACAP-38) in human plasma and milk. *Eur. J. Endocrinol.* közlésre elfogadva (IF: 3.239; azonos közreműködés Helyes Zs. és Reglődi D. részéről a közleményben megjelölve)

Az összes közlemény összesített impakt faktora: 133.843 (az eredeti közleményeké 114.215, az összefoglalóké 16.628, a lektorált levélé 3)

Az összes közleményre történő hivatkozás (SCI): 737

Az összes közleményre történő független hivatkozás (SCI): 494

SZABADALMI BEADVÁNYOK

Kéri Gy., Szolcsányi J., Pintér E., **Helyes Zs.**, Érchehyi J., Horváth A., Horváth J., Teplán I., Vadász Zs.: Eljárás neurogén és nem neurogén gyulladásgátló, valamint fájdalomcsillapító hatású heptapeptid szomatostatintartalmú származékokat tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására. 1998. 04. 24., Magyar Szabadalmi Hivatal (Iktatószám: J208/98).

Kéri Gy., Szolcsányi J., Pintér E., **Helyes Zs.**, Érchehyi J., Horváth A., Teplán I., Örfi T.: The use of somatostatin derivatives and/or of phenylhydrazones derivatives. 2000. European Patent 991073925-2107.

Juvantia Pharma (Turku, Finland), Szolcsányi J., Pintér E., **Helyes Zs.**: Anti-inflammatory and analgesic effects of compounds highly selective for the somatostatin receptor subtype sst₄. 2005. Finish Patent Application No. 20055236.

Szolcsányi J., Kéri Gy., Wáczek F., Örfi L., Pintér E., **Helyes Zs.**, Szűts T., Németh J.: 7H-pirrolo(2,3-d)pirimidin származékok, illetve gyógyászatiilag elfogadható sóik, ezt tartalmazó gyógyászati készítmények és eljárás a hatóanyag előállítására, 2004. Magyar Szabadalmi Hivatal (Ügyiratszám: P0400891/3).

Szolcsányi J., Kéri Gy., Wáczek F., Örfi L., Pintér E., **Helyes Zs.**, Szűts T., Németh J.: Patent on the production of 7H-pirrolo(2,3-d)pyrimidine derivatives, their medically administerable salts and drug preparations. New-Zealand Patent Application, 2007.

Kessler J., Kéri Gy., Horváth A., **Helyes Zs.**, Pintér E., Szolcsányi J.: Multiple N-methylated cyclic hexapeptides for the treatment of neurogenic inflammation European Patent Application No. 08.166.259.5, 2009.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítséget nyújtottak abban, hogy ez a munka elkészülhessen. Elsősorban köszönöm Pintér Erikának és Szolcsányi János Akadémikusnak, akik 13 évvel ezelőtt bevezettek ebbe a rendkívül érdekes témába, és akik nemcsak nélkülözhetetlen és mindig hasznos szakmai segítséget nyújtottak a kutatásban, de szeretükkel és támogatásukkal mindig mellettem álltak magánemberként is. Professzor Úr elhivatottságának és optimizmusának, lelkesedésének és lelkesítésének köszönhetem, hogy eredetileg eltökélt szándékom ellenére, hogy klinikus legyek, végül a kutatói hivatás mellett horgonyoztam le. Erika szakmai tudása, kitartása és szorgalma példaképként szolgál, barátsága nagy ajándék számomra. Köszönöm Barthó Loránd Professzornak, intézetünk vezetőjének, hogy támogatta oktató-kutató munkámat. Nagyon hálás vagyok egykori és jelenlegi PhD hallgatóimnak, Sándor Katalinnak, Bölskei Katának, Elekes Krisztiánnak, Szabó Árpádnak és Börzsei Ritának, akik az elmúlt évek során rengeteget dolgoztak azért, hogy új modelleket, módszereket állítsunk be, minél több érdekes eredmény szülessen, és egy jó „csapatot” hozzunk létre. Külön köszönet Perkecz Anikónak, akinek kiváló szaktudása nélkül a hisztopathológiai vizsgálatok nem valósulhattak volna meg. Köszönöm a kísérletes munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget Olasz Istvánnának (Csillának), Gógl Csabánának (Katinak) és Zöldhegyi Józsefnének (Marának). Köszönöm minden tudományos diákkörös hallgatómnak, de kiemelten Keszthelyi Dánielnek, Borbély Évának és Markovics Adriennek szorgalmukat, precíz munkájukat és azt a sok kísérleti adatot, amit prezentáltak. Köszönöm Németh Józsefnek a RIA módszerek kifejlesztését, precíz munkáját és barátságát. Köszönet kollégáimnak, Pethő Gábornak, Szőke Évának, Sándor Zoltánnak, Bánvölgyi Ágnesnek, Pozsgai Gábornak, Bán Ágnesnek, Ömböliné Dórinak, Tékus Valériának, Tóth Dánielnek, Gyulai Katalinnak és Gedeonnak és Gáspár Attilának a sok segítségért és támogatásért. Köszönöm Kereskai László és László Terézia pathológus kollégáknak a szövettani értékelést, László Jánosnak a mágneses térrel kapcsolatos kollaborációt, Varecza Zoltánnak, Pongrácz Juditnak, Molnár F. Tamásnak és Szántó Zalánnak az emberi tüdővel kapcsolatos vizsgálatokban nyújtott segítségüket. Köszönöm Reglődi Dórának a sok ötleten és kiváló szakmai segítségen túl a lelkesítést és a barátságát. Köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának a támogatást és a jó munkahelyi légkör megteremtését. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Családomnak, Férjemnek és Fiaimnak, Marcinak és Petinek, Szüleimnek, Hugomnak és Sógoromnak, hogy szeretetükkel, türelmükkel, megértésükkel és biztatásukkal mindig mellettem állnak.